

**Wirkung von Trockenstreß
auf unterschiedliche Kultivare
von Sorghum bicolor**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Volker Beyel
aus Euskirchen

Frankfurt am Main 2003

Vom Fachbereich Biologie und Informatik (FB 15) der Johann Wolfgang Goethe-Universität
als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. B. Streit

Gutachter: Prof. Dr. W. Brüggemann, Prof. Dr. G. Sandmann

Datum der Disputation:.....

Inhaltsverzeichnis:

1 Einführung - 1

- 1.1 Einleitung - 1
- 1.2 Mohrenhirse (*Sorghum bicolor*) - 2
- 1.3 Wirkung von Wassermangel auf Pflanzen - 4
- 1.4 Anpassungen an Trockenstreß - 6
- 1.5 Zielsetzung - 9

2 Material und Methoden - 11

- 2.1 Pflanzenmaterial und Anzucht - 11
 - 2.1.1 Pflanzenmaterial - 11
 - 2.1.2 Pflanzenanzucht und Streßinduktion - 11
- 2.2 Bodenzusammensetzung und Wasserspannung - 12
- 2.3 Bestimmung des pflanzlichen Wasserhaushalts - 14
 - 2.3.1 Messung des Blattdruckpotentials - 14
 - 2.3.2 Bestimmung des osmotischen Potentials der Preßsäfte - 15
 - 2.3.3 Bestimmung des Wassersättigungsdefizits - 15
- 2.4 Gaswechsellmessungen - 16
- 2.5 Transpirationmessungen - 16
- 2.6 Chlorophyllfluoreszenz-Messungen - 17
 - 2.6.1 Chlorophyllfluoreszenz-Messungen an Blattscheiben - 17
 - 2.6.2 Chlorophyllfluoreszenz-Messungen an ganzen Blättern - 19
- 2.7 Chlorophyllbestimmung - 19
- 2.8 Pigmentanalyse - 20
 - 2.8.1 Aufbereitung der Proben - 20
 - 2.8.2 Pigmenttrennung mittels HPLC - 20
 - 2.8.3 Quantifizierung der Pigmente - 21
- 2.9 Mikroskopische Methoden - 23
 - 2.9.1 Blattschnitte und Stärkefärbung - 23
 - 2.9.2 Stomata - 23
- 2.10 Enzymtests - 23
 - 2.10.1 Pyruvat-orthophosphat-dikinase (PPDK) - 24
 - 2.10.2 Phospho-*enol*-pyruvat Carboxylase (PEPCase) - 24
 - 2.10.3 NADPH-abhängige Malatdehydrogenase (MDH) - 25
 - 2.10.4 NADP-abhängiges Malatenzym (ME) - 26
 - 2.10.5 Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) - 26
 - 2.10.6 Fruktose-1,6-bisphosphatase (FBPase) - 27
- 2.11 SDS-PAGE und immunochemischer Nachweis - 28
 - 2.11.1 Probenvorbereitung - 28
 - 2.11.2 SDS-PAGE-Gelelektrophorese - 28
 - 2.11.3 Quantifizierung der Proteinbanden - 30
 - 2.11.4 Westernblotting - 30
 - 2.11.5 Immunochemischer Nachweis - 31
- 2.12 Bestimmung der C₄-Metabolite - 32
- 2.13 Datenerhebung und Statistik - 33

3 Ergebnisse - 34

- 3.1 Pflanzenanzucht und Streßinduktion - 34
 - 3.1.1 Charakterisierung des Bodens - 34
 - 3.1.2 Quantifizierung des Trockenstresses - 35
- 3.2 Vorversuche zur Auswahl und Charakterisierung geeigneter Kultivare - 37
 - 3.2.1 Photosynthesemessungen an verschiedenen *Sorghum bicolor* Kultivaren - 37
 - 3.2.2 Blattschäden - 39
 - 3.2.3 Transpirationsmessungen - 40
 - 3.2.4 Photosynthese Messungen an den Kultivaren E 36 und B 35 - 42
 - 3.2.5 F_v/F_m -Verhältnis - 43
 - 3.2.6 Pigmentgehalte - 45
- 3.3 Weiterführende Untersuchungen am jüngsten voll entwickelten Blatt - 48
 - 3.3.1 Gaswechsellmessungen - 48
 - 3.3.2 Gaswechsellmessungen unter vermindertem CO₂ Gehalt - 51
 - 3.3.3 Chlorophyllfluoreszenz-Messungen - 56
 - 3.3.3.1 Messungen unter erhöhtem CO₂ Gehalt - 56
 - 3.3.3.2 Messungen unter Anzuchtbedingungen - 61
 - 3.3.4 Enzym-Aktivitäten - 66
 - 3.3.4.1 Pyruvat-orthosphosphat-dikinase (PPDK) - 66
 - 3.3.4.2 Phospho-*enol*-pyruvat Carboxylase (PEPCase) - 67
 - 3.3.4.3 Malatdehydrogenase (MDH) - 70
 - 3.3.4.4 Malatenzym (ME) - 72
 - 3.3.4.5 Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) - 72
 - 3.3.4.6 Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) - 77
 - 3.3.5 Pigmentanalyse - 78
 - 3.3.6 C₄-Metabolite - 82

4 Diskussion - 86

- 4.1 Bewertung des verwendeten Modellsystems - 86
- 4.2 Auswahl der *Sorghum* Kultivare - 87
- 4.3 Vergleich der Kultivare E 36 und B 35 - 88
 - 4.3.1 Phänotypische Effekte - 88
 - 4.3.2 Gaswechselraten - 89
 - 4.3.3 Chlorophyllfluoreszenz - 92
 - 4.3.4 Pigmente - 95
 - 4.3.5 Enzyme - 98
- 4.4 Schlußfolgerungen - 108

5 Zusammenfassung - 110

6 Anhang - 111

- I Quellenverzeichnis - 111
- II Abkürzungsverzeichnis - 129
- III Abbildungsverzeichnis - 130
- IV Tabellenverzeichnis - 132
- V Danksagung - 133
- VI Curriculum vitae - 134

1 Einführung

1.1 Einleitung

Wassermangel stellt in weiten Teilen der Erde ein großes Problem für den Anbau von Nutzpflanzen dar. Rund 1/3 der Erdoberfläche weist ein Niederschlagsdefizit auf, was zu Einbußen bei Pflanzenwachstum und Ernteerträgen führt. Nur ca. 5% der weltweit landwirtschaftlich genutzten Fläche werden nach Angaben der Welternährungsorganisation (FAO) künstlich bewässert. Es wird vermutet, daß die Nutzpflanzen in den USA aufgrund von streßinduzierenden Bodenbedingungen, nur etwa 22% ihres genetisch möglichen Ertragspotentials erreichen (BOYER, 1982). Ungefähr die Hälfte der weltweiten Anbaufläche für Reis leidet jährlich unter Trockenheit. Neben den ökonomischen Milliarden Schäden haben Dürren leider auch im beginnenden dritten Jahrtausend immer noch verheerende Auswirkungen auf die Nahrungsmittelversorgung ganzer Länder. Aufgrund der in vielen Ländern beschränkten Wasserressourcen und der hohen Kosten von künstlichen Bewässerungssystemen ist auch in Zukunft nicht mit einer erheblichen Verbesserung der Bewässerung von landwirtschaftlichen Nutzflächen zu rechnen. Die weiterhin wachsende Weltbevölkerung, zunehmende Desertifikation landwirtschaftlicher Nutzflächen und die Auswirkungen der anthropogenen Klimaveränderung stellen die weltweite Agrarproduktion vor große Probleme. Nach Angaben der FAO wurde die Ertragsproduktion von Getreiden, den weltweit wichtigsten Nutzpflanzen, in den letzten 30 Jahren jährlich um etwa 3% gesteigert, was auf den zunehmenden Anbau von Hohertragssorten zurückzuführen ist. Diese Sorten erbringen Spitzenerträge jedoch nur unter optimalen Bedingungen und hohem Produktionsaufwand durch Düngung und Bewässerung. Da diese Form der Landwirtschaft in vielen Ländern aufgrund wirtschaftlicher oder geographischer Voraussetzungen jedoch nicht praktikabel ist, ist eine weitere Ertragssteigerung auf diesem Weg unwahrscheinlich. Gleiches gilt für die weitere Ausdehnung landwirtschaftlicher Nutzflächen durch Rodung von Waldflächen, da dieses zu tiefgreifenden Veränderungen des globalen Ökosystems führen würde. Eine alternative Methode besteht in der speziellen Züchtung von Pflanzen, die besser an widrige Umweltbedingungen wie z.B. Dürre, Nährstoffmangel, Bodentoxizität oder biologische Schädlinge angepaßt sind, so daß hohe Produktionskosten für Dünger, Pestizide und Bewässerung vermieden werden können. Das primäre Züchtungsziel für solche Kultivare besteht nicht in einer Steigerung des maximalen Ertrags, sondern in der Verbesserung und Stabilisierung des Ertrages unter Streßbedingungen. Eine interessante Modellpflanze ist dabei die Mohrenhirse *Sorghum bicolor*, welche zu den trocken-tolerantesten Getreidepflanzen zählt und in der Weltgetreideproduktion an fünfter Stelle steht (Tab. 1.1.).

Weltproduktion in t	
Mais	614.219.025
Reis	595.267.724
Weizen	589.871.831
Gerste	143.067.330
Sorghum	58.732.210

Tab. 1.1: Weltgetreideproduktion 2001
Quelle: FAO

1.2 Mohrenhirse (*Sorghum bicolor*)

Sorghum bicolor gehört zur Familie der Süßgräser (Graminaceae) und stammt aus Äquatorialafrika. Habituell gleichen die bis zu 5 m hohen *Sorghum*-Pflanzen dem Mais. Im Gegensatz zu diesem können an der Basis und höheren Knoten jedoch Seitentriebe entstehen. Die Ästchen der terminalen, zweigeschlechtlichen Rispenblüten tragen je zwei Ährchen, die 4-8mm große weiße, gelbe oder rote Körner bilden. Der Blütenstand erreicht eine Länge von 10-60cm.

Die Domestikation fand vermutlich im Gebiet des Tschad bis Abessinien vor der Zeitenwende statt (siehe Abb.1.2). Die ältesten, ca. 3000 Jahre alten Funde stammen jedoch nicht aus Afrika, sondern vom indischen Subkontinent (mündl. Information Dr. K. Neumann). Trotzdem gilt Afrika als Ursprung von *Sorghum bicolor*, da nur dort die Wildformen existieren, aus denen *Sorghum bicolor* entstand.



Abb. 1.1: Blühende *Sorghum bicolor*

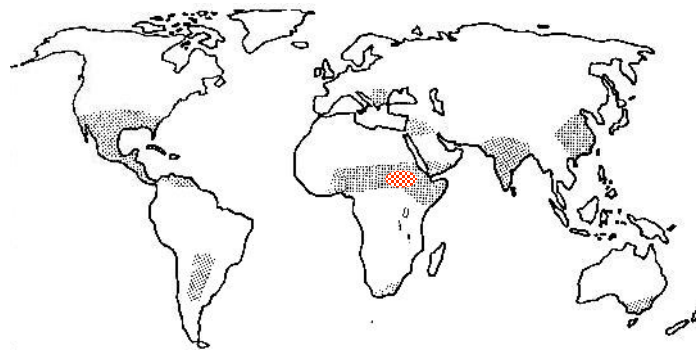


Abb. 1.2: Verbreitung und Anbau von *Sorghum bicolor*, rote Fläche: Herkunft, graue Flächen: Anbau. Abbildung verändert aus "Pflanzenproduktion und Biotechnologie", Hrsg.: MPI Köln.

Sorghum ist wie die meisten C₄-Pflanzen wärmebedürftig und frostempfindlich. Heute wird Sorghum weltweit in tropischen und subtropischen Klimaregionen kultiviert. Tabelle 1.2 zeigt die zehn größten *Sorghum*-Produzenten der Welt im Jahr 2001.

	Produktion (t)	Ertrag (t/ha)
Welt	58.732.210	1,3
USA	13.069.510	3,7
Indien	8.390.000	0,8
Nigeria	7.081.000	1
Mexiko	6.566.540	3,3
Argentinien	2.905.000	4,7
China	2.717.652	3,4
Sudan	2.488.000	0,6
Australien	2.107.000	2,5
Äthiopien	1.538.281	1,3

Tab. 1.2: Sorghum Produktion und Ertrag 2001, Quelle: FAO

Vergleicht man die erwirtschafteten Erträge pro Hektar Anbaufläche miteinander, erkennt man die in Abschnitt 1.1 beschriebenen Auswirkungen der unterschiedlich hohen Produktionsstandards. Länder wie die USA oder Argentinien erhalten durch intensiven Einsatz von Düngung und Bewässerung Erträge, die etwa 6-8fach über denen des Sudan oder Indiens liegen, in denen der Einsatz von Produktionsmitteln, wie künstlicher Bewässerung und Düngung, deutlich geringer ist. Vergleicht man die produzierte Menge des Jahres 2001 mit den Ernten vergangener Jahre, fällt im Gegensatz zu anderen Getreidesorten ein Rückgang der *Sorghum*-Produktion auf. Lag die mittlere Weltproduktion zwischen 1979-81 noch bei 65,4 Mio. Tonnen, sank sie 1992-94 auf 63,5 Mio. Tonnen und beträgt aktuell nur noch 58,7 Mio. Tonnen. Der Rückgang der Nutzung von *Sorghum* ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen. Wie bei anderen Konsumgütern unterliegt auch die Nutzung bestimmter Nahrungsmittel einer gewissen Mode. In vielen Ländern wird *Sorghum* durch leichter zuzubereitende Getreide wie z.B. Reis oder Weizen verdrängt. Die Tierfutterindustrie bevorzugt Mais gegenüber *Sorghum* als Futtermittel, da durch den höheren Carotinoidgehalt des Mais das Fleisch der Schlachttiere dunkler wird. Nur in wenigen Ländern wie z.B. Japan, wo die Nachfrage nach hellem Fleisch höher ist, wird *Sorghum* als Tierfutter bevorzugt. Durch verbesserte Trockenresistenz ist der Anbau von Mais in den letzten Jahren in nur mäßig trockenbelasteten Gebieten zu einer Alternative für *Sorghum* geworden. Aufgrund der höheren Dürresistenz und der Fähigkeit, nach Trockenperioden neue Seitentriebe zu bilden, kann *Sorghum* jedoch auch an Standorten, an denen kein Maisanbau mehr möglich ist, noch kultiviert werden und stellt somit insbesondere in trockenen Regionen Afrikas das wichtigste Getreide dar.

Sorghum eignet sich nur wenig zum Brotbacken. Ähnlich wie bei Reis wird meist das ganze Korn oder ein Brei genossen. Daneben wird *Sorghum* im südlichen Afrika auch zur Herstellung von Bier verwendet. Das Korn enthält 60 -75% Kohlenhydraten, 8-13% Eiweiß und 4-6% Fett. Einige *Sorghum*-Sorten weisen im Stengel einen hohen Saccharose- und Glukosegehalt auf (10-16%) und können alternativ zu Zuckerrohr (*Saccharum officinale*) zur Zuckerproduktion genutzt werden. In Ländern, in denen *Sorghum* nicht traditionell

als Nahrungsmittel zubereitet wird, wie z.B. den USA, wird *Sorghum* überwiegend als Tierfutter verwendet, wobei ähnlich wie beim Mais die ganze Pflanze genutzt werden kann. Weltweit finden etwa 48% der *Sorghum*-Produktion als Viehfutter Verwendung. Nachteilig ist dabei ein Glykosid in den Blättern, aus dem giftige Blausäure entstehen kann. Ein Zuchtziel stellt daher die Entwicklung von Sorten dar, die dieses Glykosid nicht mehr enthalten.

Neben abiotischen Stressoren kommt es durch Infektionen mit dem pflanzlichen Hemiparasiten (*Striga hermonthica*) jedes Jahr zu erheblichen Ernteaussfällen. Trotz der Entwicklung von *Striga*-resistenten Sorten sind etwa 40% der afrikanischen Anbaufläche durch *Striga*-Infektionen betroffen, was nach Schätzungen von ICRISAT (Internationales Forschungsinstitut für Pflanzenbau in den semiariden Tropen) zu wirtschaftlichen Verlusten von ca. 90 Mio. US Dollar im Jahr führt.

Ein Problem bei der Einführung neuer Sorten stellt der traditionelle Anbau von *Sorghum* dar, bei dem die Farmer ihr Saatgut selber produzieren. Auf diese Weise kann das Potential moderner Hybridsorten, die seit etwa 1960 entwickelt werden, nur unzureichend genutzt werden. Trotzdem ist *Sorghum bicolor* aus Sicht der Pflanzenzucht eine interessante Art, da durch die im Vergleich zu anderen Getreiden kurze Zeit der Domestikation ein großer Genpool mit vielen unterschiedlichen Eigenschaften besteht. Darüber hinaus läßt sich *Sorghum bicolor* auch leicht mit anderen *Sorghum*-Arten kreuzen, wodurch sich der verfügbare Genpool noch vergrößert.

Das Interesse im Ansatz dieser Arbeit lag in der Untersuchung von physiologischen Eigenschaften, welche die Dürre-resistenz von *Sorghum bicolor* bestimmen, um diese für zukünftige Züchtungsforschung nutzbar zu machen.

1.3 Wirkung von Wassermangel auf Pflanzen

Wassermangel kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden, wobei unterschiedliche Teile der Pflanze betroffen sein können. Die Auswirkungen auf die Pflanze sind abhängig von der Dauer der Trockenbelastung und ihrer Intensität. Hohe Strahlungsintensität an warmen Sommertagen führt durch die stomatare Transpiration während der Photosynthese zu starkem Wasserverlust der Blätter, der durch die beschränkte Nachleitgeschwindigkeit des Wassers in den Leitgeweben nicht immer ausgeglichen werden kann. Dadurch kommt es lokal zu Wassermangel in den Blättern, nicht jedoch in anderen Geweben, wie Wurzel und Sproß. Bei ausreichender Wasserversorgung der Pflanze wird dieser Verlust jedoch am Abend oder in der Nacht wieder vollständig ausgeglichen.

Ein anderer Fall tritt ein, wenn es durch fehlende Niederschläge zu einem Austrocknen des Bodens bis in tiefere Erdschichten kommt. Unter diesen Umständen kommt es zu einem Wasserverlust in der ganzen Pflanze, der nicht mehr kurzfristig kompensiert werden kann.

Der Wassermangel bewirkt einen Rückgang des Turgors. In der Wurzel kommt es zur Synthese von Abscisinsäure, die als Signalstoff für Trockenstreß unterschiedliche Effekte hervorruft. In den Blättern

kommt es zum Spaltenschluß, wodurch die Transpiration auf ein Minimum beschränkt wird. Als Folge der geschlossenen Stomata wird der Gaswechsel eingeschränkt, die CO_2 -Konzentration im Blattinneren sinkt. Der niedrige CO_2 -Partialdruck im Blattinneren führt bei C_3 -Pflanzen zu einer höheren Photorespirationsrate, statt CO_2 wird verstärkt O_2 fixiert. Das entstehende Phosphoglykolat wird abgebaut und es kommt zu einem Nettoverlust von CO_2 , der bis zu 50% des zuvor fixierten CO_2 betragen kann (HESS, 1991).

Sinkt der Turgor bei weiterem Wasserverlust stärker ab, beginnen die Zellen cytorrhytisch zu schrumpfen, die Blätter welken. Wachstumsprozesse, insbesondere das Streckungswachstum, kommen zum Erliegen. Durch die Volumenverkleinerung der Zelle kommt es zu einer Konzentrierung gelöster Stoffe, die verschiedene Effekte hervorruft. Das osmotische Potential des Zellsafts sinkt, wodurch der potentielle Einstrom von Wasser in die Zelle erleichtert wird. Viele Pflanzen akkumulieren niedermolekulare Stoffe wie Zucker und Aminosäuren in die Vakuole, um aktiv ihr osmotisches Potential zu senken. Die hohe Konzentration gelöster Stoffe im Cytoplasma oder den Plastiden beeinträchtigt jedoch den Hydratationszustand vieler Enzyme, wodurch deren Aktivität sinkt und die Sekundärreaktionen von Photosynthese und Atmung beeinträchtigt werden. So reagiert beispielsweise die Nitratreduktase besonders empfindlich auf Wassermangel, Aminosäuresynthese und Proteinbiosynthese kommen zum Erliegen. Mitosen werden verzögert und die Meiose in ihrem Ablauf gestört, wodurch die Pollenfertilität nachläßt. Bei weiter andauernder Trockenheit kommt es zur Seneszenz. Katabole Prozesse werden beschleunigt, die Zentralvakuole fragmentiert sich in kleine Teilvakuolen, die Plasmamembranen der Chloroplasten und Mitochondrien werden abgebaut. Die Kernhülle bläht sich und die Polyribosomen zerfallen und es kommt zum Zelltod.

Abbildung 1.3 zeigt den zeitlichen Ablauf der beschriebenen Prozesse:

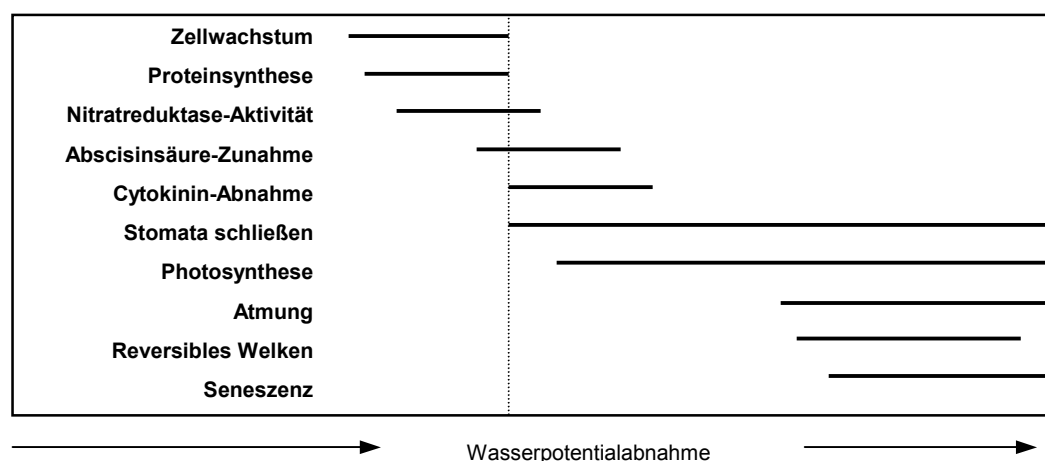


Abb. 1.3: Empfindlichkeit von Zellfunktionen auf Wassermangel. Senkrechte, gestrichelte Linie: Beginn des Spaltenschlusses. Nach HSIAO (1973) und BRADFORD und HSIAO (1982).

1.4 Anpassungen an Trockenstreß

Da Pflanzen, im Gegensatz zu den meisten Tieren, nicht in der Lage sind, unter ungünstigen Bedingungen ihr Habitat zu wechseln, haben sie in ihrer Entwicklungsgeschichte verschiedenen Strategien entwickelt, um sich an trockene Standorte bzw. trockene Perioden anzupassen. Dazu gehören sowohl Modifikationen des Entwicklungszyklus als auch morphologische und biochemische Mechanismen, welche häufig miteinander einhergehen.

Pulvioletherophyten passen sich durch einen schnellen Entwicklungszyklus an kurze Vegetationsperioden an und überdauern auch mehrjährige Dürreperioden mit austrocknungsresistenten Samen. Eine ähnliche Strategie verfolgen *Geophyten* mit Hilfe unterirdischer, ggf. wasserreicher Speicherorgane, die im Boden vor Verdunstung geschützt sind. *Geophyten* können bei guten Wachstumsbedingungen durch die größere Menge gespeicherter Nährstoffe schneller austreiben und müssen keine neuen Wurzeln bilden.

Zu den auffälligsten Anpassungen gehört die Reduktion von transpirierenden Oberflächen, durch die der Wasserverlust minimiert wird. Diese Reduktion kann zum einen saisonal durch den Abwurf von Laub während der Trockenperiode erfolgen, aber auch durch spezielle Morphologie von Sproß und Blättern, wie sie bei den wasserspeichernden Sukkulenten (z.B. *Cactaceae* und *Crassulaceae*) anzutreffen ist. Zusätzlich zu der Fähigkeit Wasser zu speichern, ist durch die kugelige Form der Sukkulenten auch die transpirierende Oberfläche in Relation zu Volumen reduziert. In extremster Form sind die Blätter völlig reduziert und der Sproß übernimmt die Funktion des Assimilationsgewebes. Diese Schutzmaßnahme gegen Wasserverlust ist oftmals verbunden mit weiteren Transpirationseinschränkungen, wie z.B. dichter Behaarung, durch die sowohl ein Teil des auftreffenden Sonnenlichts reflektiert wird, als auch über der Pflanzenoberfläche eine ruhende Luftschicht gebildet wird, welche die Diffusion von Wasserdampf verhindert. Den gleichen Sinn erfüllen in die Blattoberfläche eingesenkte Spaltöffnungen. Auch hier entsteht eine ruhende Luftschicht, deren verhältnismäßig hoher Wasserdampfdruck die Transpiration des Blattes reduziert. Einen weiteren Schutz vor Austrocknung stellt die Auflagerung von Wachsen auf der Blattoberfläche dar, welche die cuticuläre Transpiration weiter absenken und ebenfalls einen Teil des Sonnenlichts reflektieren können. Verstärktes Wurzelwachstum hin zu wasserführenden Erdschichten kann die Menge des pflanzenverfügbaren Wassers erhöhen, was jedoch aufgrund des hohen energetischen Aufwands nur dann ökonomisch ist, wenn die Wassermenge in tieferen Bodenschichten ergiebig genug ist.

Neben den morphologischen existieren auch verschiedene biochemische Anpassungen an Trockenstreß. Eine extreme Anpassung zeigen CAM-Pflanzen (Crassulaceen Acid Metabolism), die Nachts bei relativ hoher Luftfeuchte CO₂ aufnehmen und in Form von Malat in der Vakuole speichern. Am Tag wird CO₂ wieder aus Malat freigesetzt, wodurch die Pflanzen auch bei geschlossenen Stomata Photosynthese betreiben können. Durch den hohen CO₂-Partialdruck in der Zelle wird die in C₃-Pflanzen auftretende Photorespiration unterdrückt. Der Vorteil dieses Stoffwechseltyps ist ein extrem reduzierter Wasserverbrauch. In Bezug auf den fixierten Kohlenstoff verbrauchen CAM-Pflanzen mit ca. 125 g

Wasser pro g Trockenmasse etwa 4-5 mal weniger Wasser als C_3 -Pflanzen, die ca. 400 - 600 g Wasser zur Bildung von einem Gramm Trockenmasse benötigen (LARCHER, 1994) und können so auch extrem trockene Standorte besiedeln. Neben Pflanzen aus Trockengebieten vollziehen auch viele Pflanzen salziger Standorte den CAM-Stoffwechsel. Wie an trockenen Standorten stellt das extrem niedrige Wasserpotential salziger Böden ein Problem für die Wasseraufnahme in die Pflanze dar, so daß viele Merkmale trockentoleranter Pflanzen auch bei *Halophyten* zu finden sind.

Eine andere Anpassung an trockene und warme Standorte ist der von HATCH und SLACK (1966) aufgeklärte Stoffwechselweg, der als C_4 -Zyklus bezeichnet wird. Etwa 1% aller charakterisierten Pflanzenarten aus 18 verschiedenen Familien besitzen diesen Stoffwechselweg, der in der Evolution wahrscheinlich mehrfach parallel entwickelt wurde, worauf drei unterschiedliche Formen des C_4 -Stoffwechsels hinweisen. Trotz des geringen Anteils dieses Stoffwechseltyps vermutet man einen Anteil der C_4 -Pflanzen an der Gesamtkohlenstofffixierung von etwa 20%. Einige Gattungen wie z.B. *Flaveria* weisen Arten mit C_3 , C_4 und C_3/C_4 -Übergangstypen auf.

C_4 -Pflanzen fixieren CO_2 zunächst auf dem gleichen Weg wie CAM-Pflanzen. Dabei wird CO_2 in den Mesophyllzellen mittels Phospho-*enol*-pyruvat Carboxylase (PEPCase) fixiert und als C_4 -Säure in die Bündelscheidenzellen transportiert. Dort erfolgt die Decarboxylierung des C_4 -Körpers, das freiwerdende CO_2 wird, wie in C_3 -Pflanzen, endgültig im Calvin Zyklus fixiert. Im Gegensatz zur zeitlichen Trennung von primärer CO_2 -Fixierung und Photosynthese in den CAM-Pflanzen, zeigen C_4 -Pflanzen eine räumliche Kompartimentierung von CO_2 -Aufnahme und endgültiger Fixierung. Abbildung 1.4 zeigt den Querschnitt eines *Sorghum*-Blattes mit der typischen C_4 -Morphologie. Um das Leitbündel liegt ein dunkel gefärbter Ring aus Bündelscheidenzellen, der durch das Mesophyll umgeben ist.

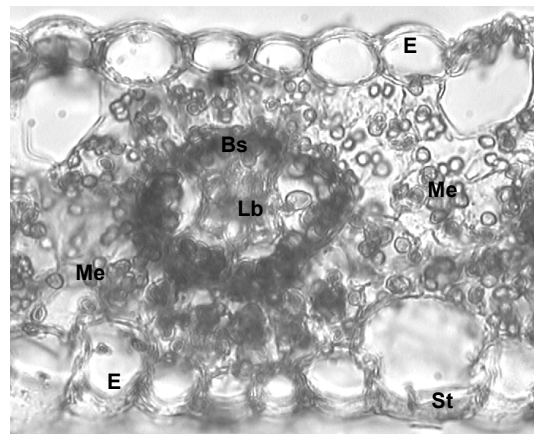


Abb. 1.4: Querschnitt durch ein C_4 Blatt.
Me: Mesophyll, Bs: Bündelscheide,
Lb: Leitbündel, St: Stomata, E: Epidermis

Der Vorteil dieses Mechanismus liegt in der Anreicherung des CO_2 -Gehalts in den Bündelscheidenzellen. Durch den 5-7fach gesteigerten CO_2 -Partialdruck in den Bündelscheidenzellen wird die Oxygenase-Funktion der Rubisco nahezu vollständig unterbunden, wodurch Energie- und CO_2 -Verluste durch die Photorespiration wie in C_3 -Pflanzen vermieden werden. Im Gegensatz zur Rubisco besitzt die PEPCase keine Oxygenase-Funktion und hat eine deutlich niedrigere Michaelis-Konstante für CO_2 , bzw. HCO_3^- . Unter trockenen Bedingungen, wenn Pflanzen die Stomata schließen und der CO_2 -Partialdruck im Blattinneren sinkt, arbeitet die PEPCase in den C_4 -Pflanzen also länger im CO_2 -gesättigten Bereich als die Rubisco in C_3 -Pflanzen. Aus diesem Grund sind C_4 -Pflanzen in der Lage, ihre Stomata bei gleicher Photosyntheseleistung weiter zu schließen, woraus eine geringere Transpirationsrate resultiert. Pro

fixiertem Gramm Trockenmasse verbrauchen C_4 -Pflanzen nur 250-300 g Wasser und liegen damit im Wasserverbrauch zwischen C_3 - und CAM-Pflanzen (LARCHER, 1994). Im Gegensatz zu den CAM-Pflanzen, die durch ihren speziellen Stoffwechsel nur sehr geringe Primärproduktionsraten erreichen, liegen die maximalen Photosyntheseraten von C_4 -Pflanzen mit ca. $30\text{-}50 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ deutlich über denen von C_3 -Pflanzen, die nur Werte von etwa $20\text{-}30 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ erreichen (LARCHER, 1994). Allerdings benötigen C_4 -Pflanzen zur Fixierung von CO_2 mehr Energie als C_3 -Pflanzen (1 ATP zur Regeneration von PEP, sieh. Abb.1.5), weshalb sie nur an trockenen sonnigen Standorten einen ökologischen Vorteil gegenüber C_3 -Pflanzen besitzen. Aufgrund der Empfindlichkeit gegen niedrige Temperaturen ($< 10^\circ\text{C}$), ist die Verbreitung der C_4 -Pflanzen auf warme Regionen beschränkt.

Abbildung 1.5 zeigt am Beispiel des NADP-abhängigen Malatenzym-Typs, zu denen auch Mais (*Zea mays*) und *Sorghum bicolor* gehören, den Ablauf des C_4 -Stoffwechsels:

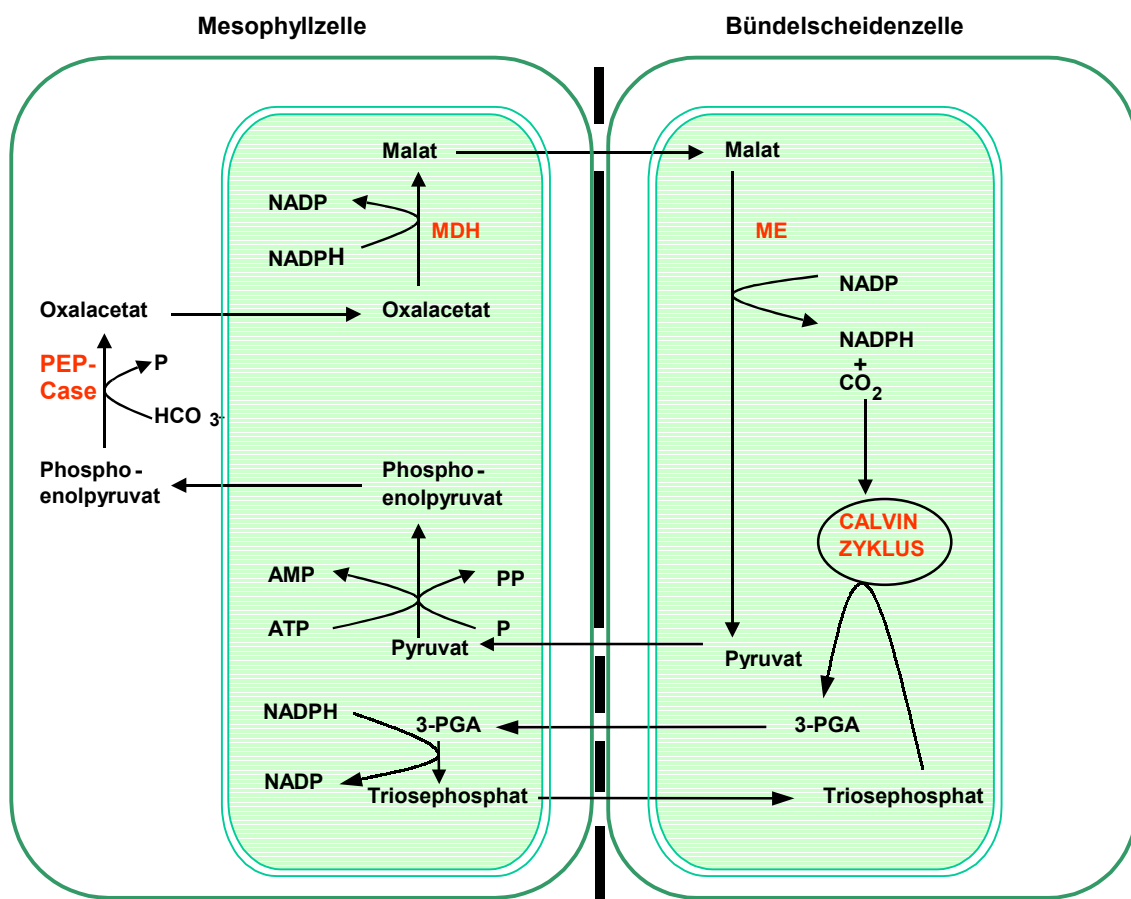


Abb. 1.5: C_4 -Stoffwechsel (NADPH-Malat-Typ)

Kohlendioxid wird in den Mesophyllzellen durch die Phospho-enol-pyruvat Carboxylase (PEPCase) in Form von HCO_3^- an Phospho-enol-pyruvat gebunden, es entsteht Oxalacetat. Dieses wird im Chloroplasten durch die Malatdehydrogenase (MDH) unter Verbrauch von NADPH zu Malat reduziert und diffundiert entlang eines Konzentrationsgefälles in die Chloroplasten der Bündelscheidenzellen. Hier wird das Malat vom Malat-Enzym (ME) unter Reduktion von NADP^+ in CO_2 und Pyruvat gespalten. Das

entstehende CO_2 und die freiwerdenden Reduktionsäquivalente (NADPH) werden im Calvin-Zyklus zur Bildung von Kohlehydraten genutzt. Pyruvat diffundiert zurück in die Mesophyllzellen, wo es unter Verbrauch von ATP durch die Pyruvat-orthosphosphat-dikinase (PPDK) zu Phospho-*enol*-pyruvat regeneriert wird.

Die über den Malat-Shuttle in die Bündelscheide transportierten Reduktionsäquivalente reichen nicht aus, um den Bedarf des Calvin Zyklus (2 NADPH pro CO_2) zu decken. Die Bündelscheidenchloroplasten, die kein PS II enthalten, produzieren kein NADPH, so daß vermutlich Phosphoglycerat (3-PGA) aus den Bündelscheidenzellen ins Mesophyll transportiert wird und dort zu Triosephosphat reduziert wird. Im Gegenzug wird Triosephosphat in die Bündelscheide transportiert um die Kohlenstoffbilanz des Calvin-Zyklus auszugleichen. Eine weitere Möglichkeit die fehlenden Reduktionsäquivalente auszugleichen ist ein zusätzlicher Austausch von Malat und Oxalacetat zwischen Mesophyll und Bündelscheidenzellen. In diesem Fall fungiert das Malat aus dem Mesophyll nicht als Kohlenstoffquelle, sondern ausschließlich als Transportform für Reduktionsäquivalente (BUCHANAN et al., 2000). Durch das fehlende PS II findet in den Bündelscheidenzellen auch keine Wasserspaltung statt, wodurch der O_2 -Gehalt in den Chloroplasten niedriger liegt als in Chloroplasten aus C_3 -Pflanzen. In Verbindung mit der höheren CO_2 -Konzentration in den Bündelscheiden wird so die Photorespiration fast vollständig vermieden.

Neben den beschriebenen morphologischen und biochemischen Merkmalen lassen sich C_3 - und C_4 -Pflanzen anhand ihres Isotopenverhältnisses des fixierten Kohlenstoffs unterscheiden. Etwa 1,1% des natürlichen Kohlenstoffs kommt als Isotop ^{13}C vor. Aufgrund eines Isotopeneffektes reagiert Rubisco mit $^{12}\text{CO}_2$ schneller als mit $^{13}\text{CO}_2$. Aus diesem Grund ist das Verhältnis von ^{12}C zu ^{13}C in Produkten von C_3 -Pflanzen niedriger als in der Atmosphäre. Die PEPCase in C_4 -Pflanzen zeigt einen deutlich verringerten Isotopeneffekt, so daß das $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ Verhältnis in C_4 -Kohlenstoffverbindungen höher ist als in C_3 -Pflanzen. Dies läßt sich mittels Massenspektroskopie nachweisen.

Auf dieser Technik beruhen auch Untersuchungen, die vermuten lassen, daß sich der C_4 -Stoffwechsel im Miozän vor ca. 5-7 Mio. Jahren aufgrund des sinkenden CO_2 -Gehalts der Atmosphäre entwickelt hat. Fossile Tierzähne und Bodenproben dieser Periode zeigen einen deutlichen Wandel der Isotopenzusammensetzung, was eine Veränderung der Flora mit einem höheren Anteil von C_4 -Pflanzen wahrscheinlich macht (CERLING et al., 1993).

1.5 Zielsetzung

Trotz umfangreicher Arbeitsansätze sind die Mechanismen der Trockenstresstoleranz insbesondere bei C_4 -Pflanzen bislang nicht vollständig verstanden. Ob die Photosynthese von C_4 -Pflanzen unter Trockenstreß letztlich wie bei C_3 -Pflanzen durch das Schließen der Stomata und damit durch ein beschränktes CO_2 -Angebot oder durch nicht-stomatäre Effekte limitiert wird, ist Gegenstand kontroverser Diskussionen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten unterschiedliche *Sorghum bicolor*-Kultivare hinsichtlich ihrer physiologischen und biochemischen Eigenschaften, welche Einfluß auf die Photosynthese unter Trockenstreß haben, untersucht werden. Diese Ergebnisse könnten dann in der Pflanzenzüchtung zur

weiteren Entwicklung und Verbesserung von *Sorghum* Sorten dienen, in denen Eigenschaften moderner Hohertragsorten mit der hohen Dürre-resistenz alter Landrassen vereint werden sollen.

Zur Umsetzung dieser Zielsetzung mußte zunächst eine geeignete Anzucht- und Streßmethode für *Sorghum bicolor* etabliert werden, die es erlaubte, Pflanzen einem reproduzierbaren Trockenstreß auszusetzen.

Im Anschluß daran wurden verschiedene *Sorghum*-Kultivare hinsichtlich ihrer Trockenstreßtoleranz getestet und zwei Sorten, die sich hinsichtlich ihrer Trockentoleranz besonders stark unterschieden, als Modellpflanzen ausgewählt.

An diesen beiden Sorten sollten im weiteren Verlauf der Arbeit Untersuchungen über die Ursachen für die unterschiedliche Trockentoleranz erfolgen. Dabei galt das zentrale Interesse Fragestellungen zur Regulation von Primär- und Sekundärprozessen der Photosynthese, die mittels Gaswechsel- und Chlorophyllfluoreszenzmessungen erfolgten und durch biochemische Untersuchungen und Studien zur Enzymatik ergänzt wurden.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial und Anzucht

2.1.1 Pflanzenmaterial

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenmaterial handelt es sich um verschiedene *Sorghum bicolor* Kultivare, deren Photosyntheseleistung hinsichtlich ihrer Trockentoleranz untersucht wurde, um die toleranteste und empfindlichste Linie für weitere Untersuchungen zu selektieren. Dazu standen die in Tabelle 2.1 gezeigten Sorten mit den in der Literatur angegebenen Eigenschaften zur Verfügung. Diese wurden in mehreren Versuchsreihen hinsichtlich ihrer Photosyntheseleistung unter Trockenstreß untersucht. In den Vorversuchen stellten sich die beiden Sorten E 36 und B 35 als die beiden unterschiedlichsten Sorten heraus. Bei der

Sorte	Eigenschaft	Quelle
E 36	tolerant	a
CSV-5	sensitiv	a
IS 22380	tolerant	a
R 16	tolerant	b
TX 7078	tolerant	c
B 35	sensitiv	c

Tab. 2.1: Verwendete Sorghum-Linien
a: JAGTAP und BHARGAVA, 1994
b: Angabe lt. ICRISAT
c: PREMACHANDRA et al., 1994

trockentoleranten Sorte E 36 handelt es sich um eine Landrasse aus Äthiopien, die uns von ICRISAT (Internationalen Forschungsinstitut für Pflanzenbau in den semiariden Tropen, Indien) zur Verfügung gestellt wurde. Die trockensensitive Hochleistungssorte Sorte B 35 erhielten wir freundlicherweise von Prof. Dr. Peter B. Goldsbrough (Purdue Universität, USA).

Von beiden Sorten wurde außerdem Saatgut aus eigener Nachzucht verwendet. Dabei entsprachen die Tochtergenerationen sowohl phänotypisch als auch physiologisch den Eltern.

Für die Ermittlung der Rubisco-Aktivitäten wurden außerdem Tomaten (*Lycopersicon esculentum* cv. Solentos) als Vergleichspflanzen verwendet.

2.1.2 Pflanzenanzucht und Streßinduktion

Das Saatgut wurde 2 Tage in einer abgedunkelten Petrischale auf feuchtem Filterpapier vorgekeimt und anschließend einzeln in quadratische Kunststofföpfe (11x11x12 cm) mit definierter Erdmenge (1000 g) gepflanzt, die verwendete Erde bestand aus einer Mischung von 25% Sand, 25% Humus und 50% Lehm Boden. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in einer Klimakammer für zunächst 7 Tage bei $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Lichtintensität unter Phillips 400W Natrium-Hochdrucklampen. Ab dem achten Tag bis zum Versuchsende betrug die Lichtintensität $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ unter Osram 1000W Hochdrucklampen, der Hell-/ Dunkelrhythmus dauerte jeweils 14/10 h. Die Lufttemperatur der Klimakammer lag bei 23°C , die relative Luftfeuchtigkeit betrug 40-60%.

Die Messungen an den Kontrollpflanzen erfolgten an den Tagen 20-21, die Pflanzen wurden während der ganzen Versuchsdauer gut bewässert.

Die gestreßten Versuchspflanzen wurden ab Tag 16 nicht mehr gegossen, bis die Erde 70% ihres maximalen Wassergehaltes verloren hatte. Ab Erreichen dieses Wassergehaltes (nach 3-4 Tagen) wurde abends die über Tag transpierte Menge Wasser ersetzt. Die Messungen an den gestreßten Pflanzen erfolgten an den Tagen 22-23. Zur Bestimmung der an die Erde gebundene Wassermenge bei Wassersättigung wurde das Gewicht wassergesättigter Erde vor Versuchsbeginn ermittelt, diese Erde dann bei 105°C im Ofen bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und aus der Differenz der Wassergehalt berechnet. Alle Messungen erfolgten, soweit nicht anders beschrieben, am jüngsten, voll entwickelten Blatt der Pflanze.

Die Anzucht der Tomaten für die Untersuchungen zur Rubisco-Aktivität erfolgte im Gewächshaus bei 20-25°C und einer Lichtintensität von 50-100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Als Substrat diente ein Boden aus 50% nährstoffarmer Anzuchterde und 50% Sand. Eine Woche vor Versuchsbeginn wurden die Pflanzen zur Licht- und Temperaturadaption in die Klimakammer überführt und mit ca. 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ beleuchtet. Die weiteren Parameter der Klimakammer entsprachen den oben Beschriebenen.

2.2 Bodenzusammensetzung und Wasserspannung

Die Verfügbarkeit von Wasser für die Pflanze ist von der Porengrößenverteilung und vom Porenvolumen des verwendeten Bodens abhängig (sich. Abb. 2.1). Sandige Böden mit großen Poren ($> 50 \mu\text{m}$) geben einen großen Teil ihres Wassers ($\approx 30\%$)

sehr leicht ab, weitere 5% sind mit steigender Bindungsstärke an Bodenpartikel gebunden, was zu einem starken Anstieg der Wasserspannung führt. Im Vergleich dazu zeigen Schluffböden einen wesentlich gleichmäßigeren Anstieg der Wasserspannung bei Wasserverlust, begründet durch den höheren Anteil von Mittelporen in diesem Bodentyp. In Tonböden mit einem höheren Anteil von Feinporen kommt es wiederum zu einem steileren Anstieg der Wasserspannung bei Wasserverlust. Um in allen Trockenstreßexperimenten vergleichbare Bedingungen

zu erhalten, wurde eine größere Menge Anzuchterde aus 25% Sand, 25% Humus und 50% Lehm gemischt, die in allen Versuchen verwendet wurde. Dieser Boden sollte durch seine Partikel- und

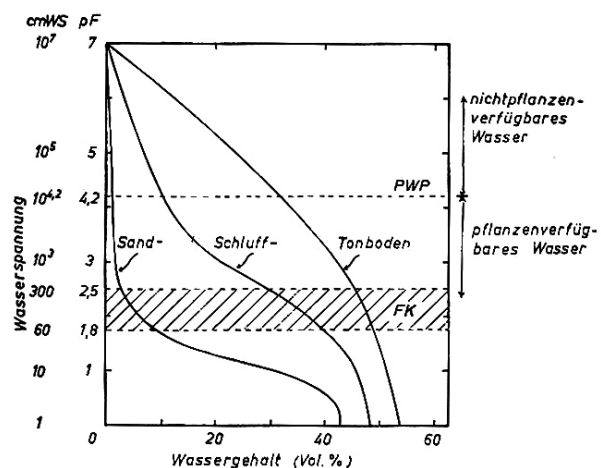


Abb. 2.1: Beziehung zwischen Wassergehalt und Wasserspannung (pF-Kurven) bei unterschiedlichen Bodentypen. (FK: Feldkapazität, PWP: permanenter Welkepunkt) Aus: Scheffer/ Schachtschnabel "Lehrbuch der Bodenkunde"

Porengröße einem Schluffboden entsprechen und bei Wasserverlust einen flachen Anstieg der Wasserspannungskurve aufweisen. Um eine Umsetzung des Bodens durch Mikroorganismen zu verhindern, wurde die Erde bis zum Gebrauch in Kunststoffässern bei 4°C gelagert.

Der Gesamtwassergehalt der wassergesättigten Anzuchterde wurde durch Trocknung bis zur Gewichtskonstanz bei 105°C bestimmt. Bei bekannter Lagerdichte des Bodens läßt sich der Gesamtwassergehalt des Bodens in Vol.% nach folgender Formel errechnen:

$$\frac{\text{Wassermenge bei Wassersättigung}}{\text{Gewicht des getrockneten Bodens}} \times 100 \times \text{Lagerdichte} = \text{Vol.\% Gesamtwassergehalt}$$

Der Anteil des nicht pflanzenverfügbaren Wassers am permanenten Welkepunkt (pF 4,2) wurde im Institut für Bodenphysik der Universität Frankfurt bestimmt. Dazu wurden aus fünf verschiedenen Behältern je drei Erdproben entnommen und in einer Druckkammer für 7 Tage einem Atmosphärendruck von 15 bar ausgesetzt, entsprechend der Wasserspannung am permanenten Welkepunkt (pF 4,2). Der Restwassergehalt wird wiederum durch Trocknung bei 105°C und anschließende Wägung ermittelt. Der Anteil in Vol.% ergibt sich aus:

$$\frac{\text{Wassermenge bei pF 4,2}}{\text{Gewicht des getrockneten Bodens}} \times 100 \times \text{Lagerdichte} = \text{Vol.\% Restwassergehalt}$$

Die Menge des pflanzenverfügbaren Wassers ergibt sich somit aus der Differenz zwischen Gesamtwassergehalt des Bodens bei Wassersättigung und dem Wassergehalt des Bodens bei pF 4,2.

Die mittlere Lagerdichte (g/l) des Bodens wurde durch Schüttversuche der Erdproben in einen Meßzylinder (750 ml) und anschließender Wägung der Erdmenge bestimmt.

2.3 Bestimmung des pflanzlichen Wasserhaushalts

Der Wasserhaushalt einer Pflanze läßt sich mit folgender Formel beschreiben:

$$-\Psi_{\text{Blatt}} = -\Psi_{\text{osm.}} + (-\Psi_{\text{Matrix}}) + \Psi_{\text{Turgor}}$$

Das Blattdruckpotential errechnet sich aus der Summe von osmotischem Potential, Matrixpotential und Turgor, wobei das osmotische Potential ($-\Psi_{\text{osm.}}$) und das Matrixpotential per Definition nur negative Werte annehmen können, wohingegen der Turgor in Blättern nur Werte von ≥ 0 annehmen kann.

Da man bei höheren Pflanzen mit Vakuole das Matrixpotential vernachlässigen kann, ergibt sich folgende, vereinfachte Formel:

$$-\Psi_{\text{Blatt}} = -\Psi_{\text{osm.}} + \Psi_{\text{Turgor}}$$

Kommt es durch sinkenden Turgor zum Welken, wird das Blattdruckpotential allein durch das osmotische Potential gebildet. Aus den Werten für das Blattdruckpotential und das osmotische Potential läßt sich bei turgeszenten Pflanzen der Turgor berechnen.

2.3.1 Messung des Blattdruckpotentials

In den Xylemelementen des Leitgewebes herrschen besonders einfache Verhältnisse des Wasserpotentials. Da das osmotische Potential der Xylemflüssigkeit in Allgemeinen < 1 bar ist, wird das Wasserpotential überwiegend durch Druckveränderungen der Wassersäule bestimmt. Dabei herrscht in den Xylembahnen ein negativer Innendruck, ein hydrostatischer Sog. Trennt man ein Pflanzenteil ab, so entspannen sich die Leitungsbahnen und die Xylemflüssigkeit wird von der Schnittstelle entfernt. Um diese Flüssigkeit zum Austritt zu bewegen, muß die ursprüngliche Druckdifferenz zwischen Xylem und Außenluft aufgebaut werden. Auf diesem Meßprinzip beruht

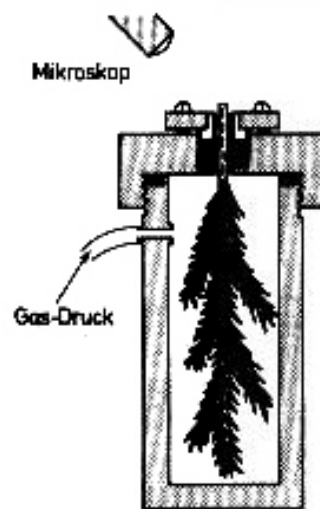


Abb. 2.2: Druckkammer zur Messung negativer Drücke. Aus: Strasburger "Lehrbuch der Botanik"

die von SCHOLANDER (1965) entwickelte Druckkammer-Methode zur Bestimmung von Blattdruckpotentialen. In eine Druckkammer wird ein abgeschnittenes Pflanzenstück so eingesetzt, daß die Schnittstelle außen dem Atmosphärendruck ausgesetzt ist (sich. Abb. 2.2). Durch Erhöhung des Drucks in der Meßkammer kommt es zum Austritt des Xylemsaftes aus der Schnittstelle, was mit einer Lupe beobachtet werden kann. Der Druck, der zum Austritt von Flüssigkeit aus der Schnittstelle

erforderlich ist, entspricht der mittleren Kohäsionsspannung bzw. dem mittleren negativen Wasserpotential des Sprosses.

Zur Bestimmung des Blattdruckpotentials der untersuchten Hirsesorten wurde die gesamte Pflanze kurz über der Erde abgeschnitten und, je nach Durchmesser des Halmes, die äußeren Blätter entfernt. Die Messung erfolgte in einer Druckkammer der Fa. SKYE, Modell SKPM 1400.

2.3.2 Bestimmung des osmotischen Potentials der Blattpreßsäfte

Die osmotischen Potentiale der Versuchspflanzen wurden anhand von Blattpreßsäften bestimmt. Zur Herstellung der Preßsäfte wurde das jüngste voll entwickelte Blatt abgeschnitten, in ein verschraubbares Reagenzglas überführt und im Wasserbad 10min bei 95-100°C. erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Blatt in eine Messingpresse überführt und mittels eines Schraubstocks zusammengepreßt. Der austretende Preßsaft wurde mit einer Pipette aufgenommen und bis zur Messung in einem Eppendorf-Cup eingefroren.

Die Osmolalität (σ) der Preßsäfte wurde anhand der Gefrierpunktniedrigung mit Hilfe eines automatischen Gefrierpunktsmometers (Osmomat 030, Fa. Gonotec, Berlin) bestimmt. Anhand der gemessenen Osmolalität des Preßsaftes konnte das osmotische Potential (Ψ_{π}) bei 25°C nach folgender Formel bestimmt werden (WALTER und KREEB, 1970):

$$\Psi_{\pi} = - (24,81 * \sigma + 0,08 * \sigma^2)$$

2.3.3 Bestimmung des Wassersättigungsdefizits

Zur Bestimmung des Wassersättigungsdefizits (WSD) wurden aus den Versuchspflanzen Blattscheiben ($\varnothing=1$ cm) ausgestochen und sofort auf einer Analysenwaage gewogen. Anschließend wurden die Blattscheiben in eine Feuchtkammer nach CATZKY (1960) überführt und dort mit Wasser aufgesättigt. Nach 24 h wurden die Blattscheiben trockengetupft und erneut gewogen. Nach der Wägung wurden die Blattscheiben bei 105°C im Trockenofen bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und das Trockengewicht bestimmt. Das Wassersättigungsdefizit (in %) errechnet sich aus:

$$\text{WSD} = \frac{\text{Frischgewicht} - \text{Trockengewicht}}{\text{Frischgewicht aufgesättigt} - \text{Trockengewicht}} * 100$$

2.4 Gaswechselfmessungen

Die Messung der Photosyntheseraten und der Transpiration sowie die daraus erfolgten Berechnungen des stomatären Widerstandes und der interzellulären CO_2 -Konzentration erfolgten mit einem tragbaren Infrarot-Photosynthesemeßgerät (LI-6200, LiCor Inc., Lincoln Nebraska, USA), welches Messungen an intakten Pflanzen erlaubt. Durch Infrarotabsorptions- und Luftfeuchtemessungen in einem geschlossenen Gaskreislauf können die CO_2 - und H_2O -Gehalte des Meßgases bestimmt werden. Mittels eines Kalkulationsprogrammes kann die Photosyntheserate, sowie stomatärer Widerstand und die interzelluläre CO_2 -Konzentration berechnet werden (von CAEMMERER und FARQUHAR, 1981; WELLES, 1986).

Die maximale Photosyntheserate der Versuchspflanzen wurde in einer Klimakammer bei 23°C , einer relativen Luftfeuchte von 50% und einem Lichtfluß von $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ermittelt. Die Beleuchtung erfolgte dabei durch Weißlicht eines Diaprojektors, der CO_2 -Gehalt des Meßgases betrug zwischen 400 und 450 ppm. Für die Messungen bei erhöhtem bzw. verringertem CO_2 -Gehalt wurde dem Meßgas künstlich CO_2 zugeführt bzw. durch Gasfluß in eine Küvette mit Natronkalk entfernt. In die Meßkammer wurden intakte Blätter eingespannt und 10-15 min äquilibriert, bevor mit der Messung begonnen wurde. Die Blattfläche der *Sorghum*-Pflanzen ließ sich aufgrund der linealen Blattform leicht aus der mittleren Blattbreite und der Länge des in der Meßkammer befindlichen Blattstücks (3,4 cm) errechnen.

Die Werte für Photosyntheserate, stomatären Widerstand und interzelluläre CO_2 -Konzentration jeder Pflanze stellen den Mittelwert aus je drei Wiederholungsmessungen dar. Jede Wiederholungsmessung der Photosynthese basiert auf der Abnahme des CO_2 -Gehalts des Meßgases um 5 ppm, bzw. 3 ppm bei gestreßten Pflanzen.

2.5 Transpirationsmessungen

Zur Bestimmung der Gesamttranspiration der jeweiligen Kultivare wurden je acht Pflanzen angezogen und trockengestreßt. Bei Erreichen des 70%igen Wasserdefizits der Erde wurden die Töpfe auf der Oberseite mit Kunststoffolie dicht verschlossen, so daß Wasser nur noch über die Pflanzen transpiriert werden konnte.

Die Töpfe wurden täglich gewogen, jeden Abend wurde die abgegebene Flüssigkeitsmenge mit Wasser aufgefüllt. Nach drei Tagen wurden die Pflanzen abgeschnitten und die Blattfläche sowie der Anteil intakter und geschädigter Bereiche bestimmt. Dazu wurden die Blätter kopiert, ausgeschnitten und gewogen. Die Blattfläche ließ sich anschließend durch das Wiegen einer Referenzfläche errechnen. Aus der Blattfläche und der transpirierten Wassermenge wurde die mittlere Verdunstungsrate der intakten, bzw. der Gesamtblattfläche ermittelt.

2.6 Chlorophyllfluoreszenz-Messungen

Die Analyse der Chlorophyll-a-Fluoreszenz bei Raumtemperatur ist eine nicht-destruktive Methode, die Rückschlüsse auf den Zustand des Photosystems II erlaubt. Zur Auswertung werden die Parameter der Grundfluoreszenz (F_0), der maximaler Fluoreszenz (F_m) und der variablen Fluoreszenz (F_v) verwendet (sich. Abb. 2.3). Die Grundfluoreszenz wird unter Verwendung sehr geringer Lichtstärken ($\text{PFD} < 1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ermittelt, wodurch es nicht zur Reduktion des primären Elektronenakzeptors (Q_A) des PS II kommt. Durch einen sättigenden Lichtblitz ($\text{PFD } 3500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) wird das gesamte Q_A reduziert und die Fluoreszenzausbeute wird maximal (F_m). Die Differenz zwischen Grundfluoreszenz und maximaler Fluoreszenz bezeichnet man als variable Fluoreszenz (F_v). Der Quotient F_v/F_m stellt ein Maß für die Effizienz der photochemischen Reaktionen des PS II dar (KRAUSE und WEIS, 1991).

Durch den Chloroplastendimorphismus der C_4 -Pflanzen ist PS II in den Bündelscheidenchloroplasten stark reduziert. Aus diesem Grund lassen sich aus den Chlorophyllfluoreszenzdaten des PS II nur Aussagen über die Mesophyllzellen treffen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl Chlorophyllfluoreszenz-Messungen an Blattscheiben unter erhöhten CO_2 -Konzentrationen, als auch an intakten Blättern unter Anzuchtbedingungen durchgeführt.

2.6.1 Chlorophyllfluoreszenz-Messungen an Blattscheiben

Die durchgeführten Messungen beruhen auf dem Prinzip der Puls-Amplituden-Modulation (SCHREIBER, 1986). Durch die Pulsation des Meßlichts bleibt die Messung dabei unbeeinflusst von Stärke und Zusammensetzung des Lichtblitzes bzw. des aktinischen Lichts. Um stomatare Einflüsse auf die Messung auszuschließen, wurde die Blattröhrchen für die Messung mit einem speziellen Meßgas (Messer Griesheim, Krefeld) gefüllt, welches einen erhöhten CO_2 - (4,5%) und verminderten O_2 -Gehalt (2%) aufwies.

Die verwendete Meßapparatur bestand aus folgenden Geräten:

• Grundgerät	PAM 101, Walz
• Flash Trigger Control	PAM 103, Walz
• Emitter/Detektor	ED 800T, Walz
• Kaltlichtquelle für aktinisches Licht	KL 1500, Schott
• Quelle für sättigenden Lichtblitz	KL 1500, Schott
• Fiberoptik	Walz
• Blattscheibenküvette	Walz
• Kryostat	K 20, Haake
• Schreiber	102, Servogor

Für die Messung wurde eine Blattscheibe in die Blattkuvette (temperiert auf 23°C) eingelegt und 10 Minuten vorverdunkelt. Danach wurde fünf Minuten lang die Grundfluoreszenz (F_0) durch Einschalten eines 1.6 kHz frequenzmodulierten Meßlichts ($\lambda = 650 \text{ nm}$) aufgenommen und die maximale Fluoreszenz durch zwei sättigende Lichtblitze ($3500 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) bestimmt. Aufgrund der geringen Lichtintensität des Meßlichts ($< 1 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) blieb der Reduktionszustand von Q_A unbeeinflusst. Anschließend wurde das Blatt für 15 min mit aktinischem Licht beleuchtet ($400 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) und die Frequenz des Meßlichts auf 100kHz erhöht. Nach der Lichtphase erfolgte zum Schluß erneut eine 15 minütige Verdunklung, während der die Frequenz des Meßlichts wieder auf 1.6 kHz geschaltet wurde. Während der gesamten Versuchsdauer wurden alle 2 min sättigende Lichtblitze ($3500 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) gegeben und die Fluoreszenz verfolgt (sich. Abb. 2.3).

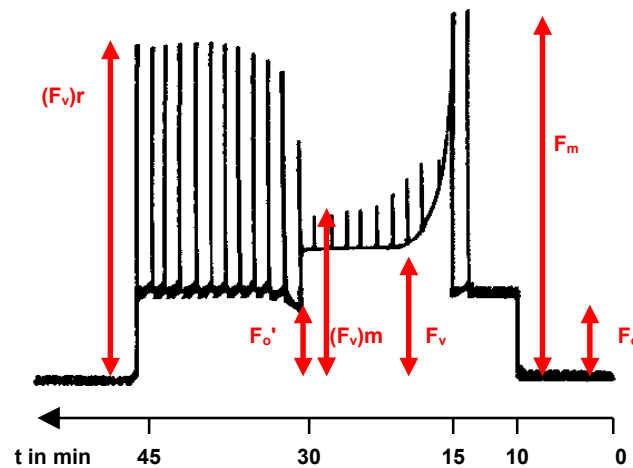


Abb. 2.3: Ermittlung der Lösungsparameter aus einer Fluoreszenzkurve

Mit den aus der Kurve ermittelten Werten für die Grundfluoreszenz (F_0), die maximale Fluoreszenz (F_m), die variable Fluoreszenz (F_v), dem Peak über der variablen Fluoreszenz ($[F_v]_m$) und dem Peak nach Relaxation ($[F_v]_r$) lassen das F_v/F_m -Verhältnis, die Lösungskoeffizienten q_p und q_n (SCHREIBER et al., 1986) sowie die Quantenausbeute $\Phi_{PS II}$ (GENTY et al., 1989) bestimmen.

$$F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$$

F_v/F_m -Verhältnis

$$\Phi_{PS II} = ([F_v]_m - F_v) / [F_v]_m$$

Quantenausbeute

$$q_p = ([F_v]_m - F_v) / ([F_v]_m - F_0)$$

photochemischer Lösungskoeffizient

$$q_n = (F_m - [F_v]_m) / (F_m - F_0)$$

nicht-photochemischer Lösungskoeffizient

Unter geeigneten Bedingungen kann q_n in die Komponenten q_e , q_t und q_f aufgelöst werden (WALTERS und HORTON, 1991; QUICK und STITT, 1989). Ist die zeitliche Auflösung in alle drei Komponenten nicht möglich, lassen sich q_t und q_e zu q_f zusammenfassen (BRÜGGEMANN, 1992):

$$q_f = ([F_v]_r - [F_v]_m) / ([F_v]_r - F_0) \quad \text{schnell relaxierender Löschungskoeffizient}$$

$$q_i = (F_m - [F_v]_r) / (F_m - F_0) \quad \text{photoinhibitorischer Löschungskoeffizient}$$

2.6.2 Chlorophyllfluoreszenz-Messungen an ganzen Blättern

Um die Chlorophyllfluoreszenz unter Anzuchtbedingungen zu bestimmen, wurde die in 2.6.1 beschriebene Apparatur in der Klimakammer installiert. Anstatt in die Blattküvette wurde der Lichtleiter in einem Winkel von ca. 45° direkt auf das Blatt gerichtet, an welchem zuvor die in Kapitel 2.4 beschriebenen Gaswechsellmessungen durchgeführt wurden. Das Meßprotokoll entsprach dem der Messungen an Blattscheiben (siehe. Kap. 2.6.1).

2.7 Chlorophyllbestimmung

Für die Chlorophyllbestimmung wurde mit einem Korkbohrer eine Blattscheibe ausgestochen, in ein Reagenzglas mit 4 ml 100%igen Aceton überführt und mit einem Glasstab zerrieben. Die Acetonlösung wurde 48h im Kühlschrank aufbewahrt, bis die Blattstücke völlig entfärbt waren. Anschließend wurde die Lösung mit einem ml Aqua dest. auf 80% verdünnt und spektralphotometrisch nach ARNON (1949) bestimmt:

$$\text{Chl. a+b (mg/l)} = 20,2 (E_{645} - E_{750}) + 8,02 (E_{663} - E_{750})$$

$$\text{Chl. a (mg/l)} = 12,7 (E_{663} - E_{750}) - 2,69 (E_{645} - E_{750})$$

$$\text{Chl. b (mg/l)} = 22,9 (E_{645} - E_{750}) - 4,68 (E_{663} - E_{750})$$

Aus dem gleichen Pigmentextrakt wurden die Gesamt-Carotinoide nach RÖBBELEN (1957) bestimmt:

$$\text{Carotinoide (mg/l)} = 475 (E_{452,5} - E_{750}) - 0,226 \text{ Chl.a+b}$$

2.8 Pigmentanalyse

Da die Carotinoidbestimmung nach RÖBBELEN (1957) nicht zwischen den einzelnen Carotinoiden differenziert, wurden die Blattpigmente mittels der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) getrennt und quantifiziert. Darüber hinaus ließ sich auf diese Weise herauszufinden, ob sich die beiden Kultivare in ihren Reaktionen des Xanthophyllzyklus auf Trockenstreß unterscheiden.

2.8.1 Aufbereitung der Proben

Um einen möglichst vollständigen Deepoxidationsgrad der Pigmente des Xanthophyllzyklus zu erreichen, wurden die Pflanzen vor Versuchsbeginn für mindestens 45 min in Schwachlicht ($<10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) überführt. Aus dem jüngsten voll entwickelten Blatt wurden mittels eines Korkbohrers sechs Blattscheiben ($\varnothing=12 \text{ mm}$) ausgestochen und unterschiedlich lange (0, 5, 10, 15, 20 und 30 min) in einer Petrischale auf feuchtem Filterpapier bei 400, bzw. $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ belichtet. Anschließend wurden die Blattscheiben sofort in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff eingefroren und zerstoßen. Nach Zugabe von 2 ml 100%igem Aceton und einer Spatelspitze CaCO_3 wurde die Probe noch eine Minute weiter zerrieben, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und anschließend in einer Tischzentrifuge (Microfuge 5415D, Eppendorf, Hamburg) 2 min bei voller Drehzahl zentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert (Schleicher&Schuell, PTFE-Einmal-Mikrofilter, $0,2 \mu\text{m}$) und bis zur Messung dunkel bei -20°C aufbewahrt.

2.8.2 Pigmenttrennung mittels HPLC

Die Trennung der Pigmente erfolgte mittels einer reversed-phase Chromatographie, d.h. unpolare Blattpigmente verweilen länger auf der Trennsäule und werden erst durch ein unpolares Lösungsmittel eluiert.

Das System bestand aus folgenden Komponenten:

- | | |
|---|-----------|
| • zwei Pumpen, BT3020 | Biotronik |
| • Gradientenmischer, JA50 | Jasco |
| • Mischkammer, M 800 | Biotronik |
| • UV/VIS Spektrometer, BT 3030 | Biotronik |
| • Schreiber/Integrator, C-R6A | Shimadzu |
| • Injektionsventil, 7125 mit $20 \mu\text{l}$ Probeschleife | Rheodyne |
| • 6-fach Umschaltventil, 7060 | Rheodyne |
| • Trennsäule LiChrospher, 100RP-18, 250/4mm | Jasco |
| • Vorsäule, 5/4mm | Jasco |

Das benutzte Trennverfahren entspricht der von FÄRBER (1998) verwendeten Methode. Die Trennung der Pigmente erfolgte durch folgendes Programm, die Flußrate betrug konstant 2 ml/min:

t in min.	Aktion
0 - 9	100% Lösungsmittel A
9 - 12,5	linearer Gradient auf 100% Lösungsmittel B
12,5 - 18	100% Lösungsmittel B
18 - 19	linearer Gradient auf 100% Lösungsmittel A
19 - 23	100% Lösungsmittel A

Lösungsmittel A:

87% Acetonitril
10% Methanol
3% Tris (0,1 M; pH 8,0)

Lösungsmittel B:

80% Methanol
20% Hexan

2.8.3 Quantifizierung der Pigmente

Die Detektion der eluierten Pigmente erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 440 nm. Die Pigmente wurden anhand ihrer Retentionszeiten bzw. der zeitlichen Abfolge ihrer Elution identifiziert. Die Flächen der Absorptionspeaks wurde durch den Integrator berechnet. Für die Bestimmung der Pigmentmengen aus den Integratorwerten wurden aufgrund der übereinstimmenden Methode die von FÄRBER (1998) publizierten Umrechnungsfaktoren verwendet. Der notwendige Geräteabgleich erfolgt mittels eines β -Carotin-Standards. Dazu wurde ein acetonischer Pigmentextrakt aus *Sorghum bicolor* auf eine Dünnschichtchromatographie-Platte (Kieselgel 60, Merck) aufgetragen und in einer mit Lösungsmittel (100ml Petroleumbenzin, 10ml Isopropanol, 0,25ml H₂O) beschickten Kammer inkubiert. Nachdem die Lösungsmittelfront den oberen Rand erreicht hatte, wurden die Pigmente mit Ethanol aus dem Kieselgel extrahiert und in der HPLC auf ihre Reinheit überprüft. Die Konzentration wurde anhand publizierter Extinktionskoeffizienten (DAVIES, 1976) photometrisch bestimmt (Ultrospec 2000, Pharmacia) und zu den Flächen der Absorptionspeaks in Beziehung gesetzt.

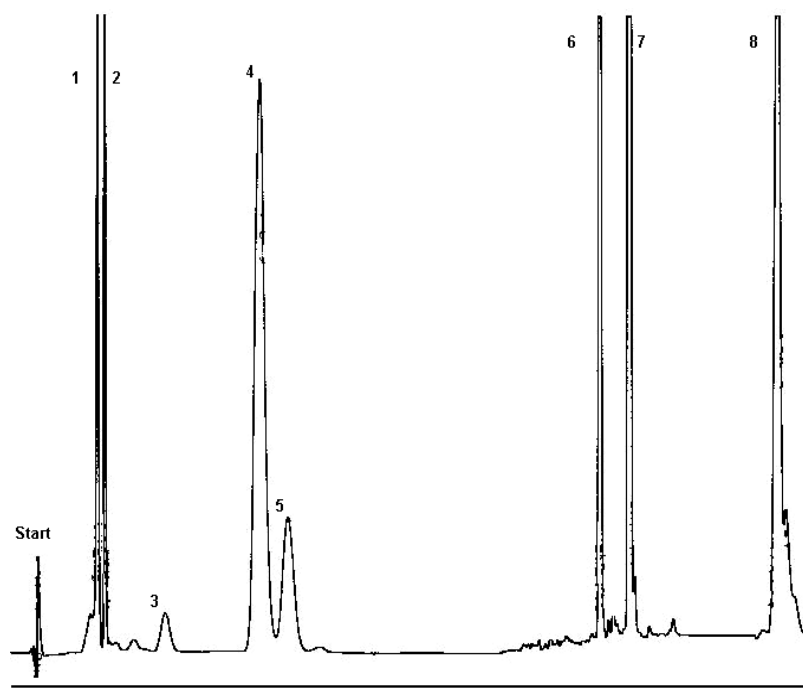


Abb. 2.4 Beispielchromatogramm

Abbildung 2.4 zeigt ein typisches Beispielchromatogramm. Die Banden der einzelnen Pigmente und ihre Retentionszeiten sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Da sich die Retentionszeiten durch äußere Einflüsse wie z.B. Temperatur oder Alter der Säule verändern, sind die mittleren Retentionszeiten angegeben. Die relative Peakfläche pro pmol Pigment wurde aus den von FÄRBER (1998) publizierten Daten und dem Gerätefaktor errechnet.

	rel. Fläche/pmol	mittl. Retentionszeit (min)
1. Neoxanthin	60,5	2,5
2. Violaxanthin	71,4	2,7
3. Antheraxanthin	56,7	4,1
4. Lutein	56,7	6,1
5. Zeaxanthin	58,7	6,7
6. Chl. b	25,4	13,3
7. Chl. a	26,4	13,8
8. β -Carotin	70,3	17,2

Tab. 2.2: Retentionszeiten und Umrechnungsfaktoren der eluierten Pigmente

2.9 Mikroskopische Methoden

2.9.1 Blattschnitte und Stärkefärbung

Um zu sehen, ob sich unter Trockenstreß die Menge an transitorischer Stärke in den Blättern verändert, wurden Blätter von trockengestreßten Pflanzen und Kontrollpflanzen zum Ausbleichen in 70°C warmen Alkohol geschwenkt. Von den Blättern wurden anschließend Quer- und Längsschnitte angefertigt und mit Jod-/Jodkalium-Lösung angefärbt, mikroskopiert und digital fotografiert (Panasonic GR-KR222 CCD Videokamera mit Zeiss KS 200 Software).

2.9.2 Stomata

Zur Bestimmung der Stomatazahl von Blattober- und Unterseiten der beiden Kultivare wurden einige Blattstellen (ca. 0,5 cm²) dünn mit farblosem Nagellack eingestrichen. Nachdem der Lack getrocknet war, wurde die Schicht vorsichtig mit einer Pinzette abgezogen, mikroskopiert und fotografiert (s.o.). Mittels eines Eich-Okulars konnte die Fläche bestimmt werden und die Stomatazahl pro mm² ermittelt werden.

2.10 Enzymtests

Die Aktivitätsmessungen der C₄-Enzyme erfolgten nach der Methode von DU et al. (1998). Verwendet wurde jeweils das jüngste voll entwickelte Blatt. Dieses Blatt wurde zur maximalen Aktivierung der Photosynthese für 15 min mit 2000 µE m⁻² s⁻¹ belichtet. Anschließend wurde die Photosyntheserate bestimmt und aus demselben Blattsegment mit einem Korkbohrer (Ø = 7 mm) fünf Blattscheiben ausgestochen. Die Homogenisation der Blattscheiben erfolgte in einem eisgekühlten Mörser mit 2 ml Homogenisationsmedium, 20 mg Polyclar und etwas Seesand.

Homogenisationsmedium:

50 mM	Tris/HCl	pH 7,9
8 mM	MgCl ₂	
5 mM	Pyruvat	
1 mM	EDTA	
2 mM	K ₂ HPO ₄	
20 mM	DTT	
0,3%	(w/v) BSA	

Das Homogenat wurde anschließend in einer Tischzentrifuge 1min bei 13.000 rpm abzentrifugiert (MK 202, Sigma), der Überstand abgenommen und aliquotiert. Die Proben für die MDH/Rubisco/ME und PEPCase-Messungen wurden bis zur Verwendung auf Eis gelagert, der Extrakt zur PPK-Messung wurde sofort bei Raumtemperatur verwendet, da die PPK-Aktivität auf Eis sank. Alle Enzymmessungen erfolgten an einem Pharmacia Photometer (Ultrospec 200) bei einer Wellenlänge von 340 nm und einer Temperatur von 23°C in Glasküvetten. Vor jeder Reaktion wurde der Vorlauf der Extinktion für mindestens 3 min aufgezeichnet.

2.10.1 Pyruvat-orthophosphat-dikinase (PPDK)

Da die PPK-Aktivität nicht direkt spektralphotometrisch verfolgt werden kann, erfolgt die Messung indirekt über die Umsetzung von Phospho-*enol*-pyruvat zu Oxalacetat, welches zu Malat reduziert wird. Dabei wird NADH verbraucht, dessen Extinktionsabnahme bei einer Wellenlänge von 340 nm zu verfolgen ist. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von MDH.

Reaktionsmedium:

25 mM	Hepes/KOH	pH 8,0
10 mM	NaHCO ₃	
1 mM	Glukose-6-phosphat	
2,5 mM	Pyruvat	
2,5 mM	K ₂ HPO ₄	
5 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄	
0,2 mM	NADH	
10 mM	DTT	
8 mM	MgSO ₄	
2 U/ml	Phospho- <i>enol</i> -pyruvat Carboxylase (Fluka 79414)	
12 U/ml	Malatdehydrogenase (Boehringer Mannheim, 127248)	
1 mM	ATP	

2.10.2 Phospho-*enol*-pyruvat Carboxylase (PEPCase)

Die maximale Aktivität der Phospho-*enol*-pyruvat Carboxylase wurde aus dem gleichen Extrakt bestimmt wie die der PPK. Gemessen wurde der NADH-Umsatz der Folgereaktion von Oxalacetat zu Malat, der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von MDH (s.o.).

Reaktionsmedium:

100 mM	Tris/HCl	pH 7,8
10 mM	MgCl ₂	
15 mM	Kaliumhydrogencarbonat	
10 mM	DTT	
0,2 mM	NADH	
200 mM	Phospho- <i>enol</i> -pyruvat	
6 U/ml	Malatdehydrogenase (Boehringer Mannheim, 127248)	

Zur Bestimmung des pH-Optimums der PEPCase-Aktivität erfolgten weitere Messungen der Enzymaktivität mit verschiedenen 100 mM Tris/HCl Reaktionspuffern in einem pH-Bereich von 7,1 - 8. Da die PEPCase-Aktivität u.a. durch Malat gehemmt wird, wurde den Reaktionsansätzen mit unterschiedlichem pH-Wert in weiteren Versuchen verschiedene Konzentrationen Malat (0-10 mM) beigelegt. Um den pH Wert des Reaktionsansatzes durch das zugesetzte Malat nicht zu verändern, wurde die Malatlösung mit Kaliumhydroxid neutralisiert.

2.10.3 NADPH-abhängige Malatdehydrogenase (MDH)

Die Aktivität der NADPH-abhängigen Malatdehydrogenase wurde anhand der Extinktionsabnahme von NADPH bei 340 nm bestimmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Oxalacetat gestartet..

Reaktionsmedium:

100 mM	Tris/HCl	pH 7,9
10 mM	MgCl ₂	
10 mM	DTT	
0,2 mM	NADPH	
0,4 mM	Oxalacetat	

Da die MDH als Thioredoxin-reguliertes Enzym durch das im Homogenisations- und Reaktionsmedium vorhandene DTT maximal reduziert und aktiviert wurde, ließen die erhaltenen Aktivitäten keinen Rückschluß auf den in vivo Aktivierungsgrad zu. Dieser wurde in einem weiteren Experiment ermittelt, in dem die in vivo MDH-Aktivität bestimmt wurde (SCHEIBE und STITT, 1988).

Um Oxidationen durch Luftsauerstoff zu verhindern, wurden alle Medien vor Versuchsbeginn entgast und anschließend unter einer Stickstoffatmosphäre aufbewahrt. Der Mörser wurde ebenfalls während der Extraktion ständig mit Stickstoff gespült.

Homogenisationsmedium:

50 mM	Na-Acetat	pH 6,0
0,1%	Triton X-100	
0,3%	BSA	
4 mM	DTT	

Zur Bestimmung der maximalen Aktivität wurde ein Aliquot des Homogenats mit 125 mM DTT in 100 mM Tris/HCl Puffer pH 8,0 für 20 min bei Raumtemperatur maximal aktiviert. Der in vivo Aktivierungsgrad errechnet sich aus:

$$\text{Aktivierungsgrad in \%} = (\text{Aktivität ohne DTT} / \text{max. Aktivität}) \times 100$$

2.10.4 NADP-abhängiges Malatenzym

Die Aktivität des NADP-abhängigen Malatenzyms wurde aus dem gleichen Extrakt bestimmt wie die der anderen C₄-Stoffwechsel Enzyme. Gemessen wurde die Extinktionszunahme des Umsatzes von NADP zu NADPH bei 340 nm, der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von Malat.

Reaktionsmedium:

25 mM	Tris/HCl	pH 8,0
0,2 mM	EDTA	
10 mM	MgCl ₂	
10 mM	DTT	
0,5 mM	NADP	
5 mM	Malat	

2.10.5 Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (Rubisco)

Die Aktivität der Rubisco wurde aus dem gleichen Extrakt bestimmt wie die der C₄-Stoffwechsel-Enzyme. In den Proben, die später gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden, befand sich kein BSA im Extraktionspuffer. Gemessen wurde der NADH-Verbrauch der Phosphoglycerat-Reduktion. Zur vollständigen Aktivierung der Rubisco wurde der Extrakt vor der Messung 20 min lang auf Eis mit 20 mM MgCl₂ und 25 mM K₂CO₃ inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ribulosebisphosphat gestartet. Die Aktivitätsmessung der *Lycopersicon*-Proben erfolgte analog.

Reaktionsmedium:

50 mM	Hepes/KOH	pH 8.0
10 mM	NaHCO ₃	
10 mM	KCl	
1 mM	EDTA	
20 mM	MgCl ₂	
5 mM	DTT	
2,5 mM	ATP	
0,2 mM	NADH	
5 mM	Phosphokreatin	
20 U/ml	Kreatinkinase	
6 U/ml	Phosphoglyceratkinase	
6 U/ml	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase	
0,6 mM	Ribulosebisphosphat	

2.10.6 Fruktose-1,6-bisphosphatase (FBPase)

Die Bestimmung der FBPase-Aktivität erfolgte nach der Methode von BRÜGGEMANN et al. (1994). Nach Bestimmung der Photosyntheserate wurde eine Blattscheibe ausgestochen und in einem eisgekühlten Mörser mit 1 ml Homogenisationspuffer zerrieben, in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert (MK 202 Kühltzentrifuge, Sigma). Aus dem Überstand wurde die Enzymaktivität indirekt anhand der Folgereaktion (Fruktose-1,6-P \rightarrow Fruktose-6-P \rightarrow Glukose-6-P \rightarrow 6-Phosphoglukonat) bestimmt. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe des Extraktes.

Homogenisationsmedium:

50 mM	Tris/HCl	pH 8,0
10 mM	MgCl ₂	
1 mM	EDTA	
1 mM	Fruktose-1,6-bisphosphat	
15 mM	Mercaptoethanol	
2% (w/v)	Polyclar	
0,1% (w/v)	Triton X-100	

Reaktionsmedium:

100 mM	Tris/HCl	pH 8,8
20 mM	MgCl ₂	
1 mM	EDTA	
0,5 mM	NADP	
4 mM	Fruktose-1,6-bisphosphat	
10 mM	DTT	
1,4 U/ml	Glukosephosphat Isomerase	
0,7 U/ml	Glukose-6-Phosphatdehydrogenase	

2.11 SDS-PAGE-Gelelektrophorese und immunochemischer Nachweis

2.11.1 Probenvorbereitung

Da in diesem Versuch die Rubisco-Aktivität mit dem Rubisco-Gehalt der Extrakte verglichen werden sollte, wurden die gleichen Extrakte wie zur Messung der Rubisco-Aktivität verwendet. Die Extraktion erfolgte analog wie in 2.10 beschrieben, jedoch ohne BSA im Homogenisationsmedium.

Die verwendeten Blattextrakte wurden vor der Gelelektrophorese mit dem äquivalenten Volumen SDS-Probenpuffer gemischt und für 5 min auf 95°C erhitzt.

SDS-Probenpuffer:

120 mM	Tris/HCl	pH 6,8
4%	SDS	
10%	β-Mercaptoethanol	
20%	Glycerin	
0,1%	Bromphenolblau	

2.11.2 SDS-PAGE-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden mit Hilfe der Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht getrennt (LAEMMLI, 1970). Für die Western-Blot-Untersuchung wurden 12,5% AA-Minigele (100 * 80 * 1 mm) mit 5% AA-Sammelgelen verwendet. Für den Vergleich der Proteinmengen aller Proben wurden Gele der Abmessungen 300 * 200 * 1 mm in den gleichen AA-Konzentrationen verwendet.

12,5% Trenngel (Mengen für je 1 Minigel):

2,5 ml	30% AA-Lösung
1,5 ml	Trenngelpuffer
2 ml	Aqua bidest
3,5 µl	TEMED
60 µl	10% Ammoniumpersulfatlösung

5% Sammelgel:

0,45 ml	30% AA-Lösung
0,75 ml	Sammelgelpuffer
1,8 ml	Aqua bidest
3 µl	TEMED
36 µl	10% APS

Trenngelpuffer:

1,5 M	Tris/HCl	pH 8,8
0,4%	SDS	

Sammelgelpuffer:

0,5 M	Tris/HCl	pH 6,8
0,4%	SDS	

Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur bei einer Spannung von 100 V für etwa zwei Stunden. Im Anschluß daran wurden die Gele mit Comassie™-Färbelösung eine Stunde gefärbt, danach zweimal für je eine Stunde entfärbt und in destilliertem Wasser gewaschen. Die für den immunochemischen Nachweis verwendeten Gele wurden nicht gefärbt. Als Molekulargewichtsstandard für die mit Comassie™ gefärbten Gele fanden die *High Range*- und *Low Range*-Molekulargewichtsmarker der Fa. SIGMA Verwendung. Die Gele für den Western Transfer wurden mit einem pre-stained Molekulargewichtsmarker Roti®-Mark PRESTAINED, (Fa. Roth) markiert.

Elektrophoresepuffer:

25 mM	TRIS
192 mM	Glycin
0,1%	SDS

Comassie™- Färbelösung:

30%	Methanol
7%	Essigsäure
0,07%	Coomassie™- Brilliant Blue R 250, Serva

Entfärbelösung:

30%	Methanol
7%	Essigsäure

SIGMA High Range Marker:

Myosin	200 kDa
β-Galactosidase	116 kDa
Phosphorylase b	97,5 kDa
Rinderserumalbumin	66,0 kDa
Aldolase	39,2 kDa

SIGMA Low Range Marker:

Phosphorylase b	97,5 kDa
Rinderserumalbumin	66,0 kDa
Aldolase	39,2 kDa
Triosephosphat-Isomerase	26,6 kDa
Trypsin-Inhibitor	21,5 kDa
Lysozym	14,4 kDa

Roti®-Mark PRESTAINED Transfermarker:

Myosin	200 kDa
β-Galactosidase	119 kDa
Rinderserumalbumin	66,0 kDa
Ovalbumin	43,0 kDa
Carboanhydrase	29,0 kDa
Trypsin-Inhibitor	20,0 kDa
Lysozym	14,5 kDa

2.11.3 Quantifizierung der Proteinbanden

Um die Rubisco Menge auf die Blattfläche beziehen zu können, wurden jeweils gleiche Extraktmengen in die Probestaschen gefüllt und nicht, wie oft üblich, gleiche Proteinmengen. Zur Abschätzung der absoluten Rubisco Menge in den Blattextrakten dienten die definierten Proteinmengen des Längenstandards. Nach der Färbung der Gele wurden diese gescannt (Primax, Modell FB 31 DD) und die relative Stärke der LSU-Rubisco-Bande mit den Banden des Längenstandards mittels eines Analyseprogramms (SigmaGel™, Version 1.0) miteinander verglichen und in Beziehung gesetzt.

2.11.4 Westernblotting

Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele für den immunochemischen Nachweis zunächst für 10 min in Kathodenpuffer äquilibriert. Die Nitrocellulosemembran wurde für den gleichen Zeitraum in Anodenpuffer äquilibriert. Der Aufbau der Transferapparatur (Biometra) ist in Abb. 2.5 dargestellt:

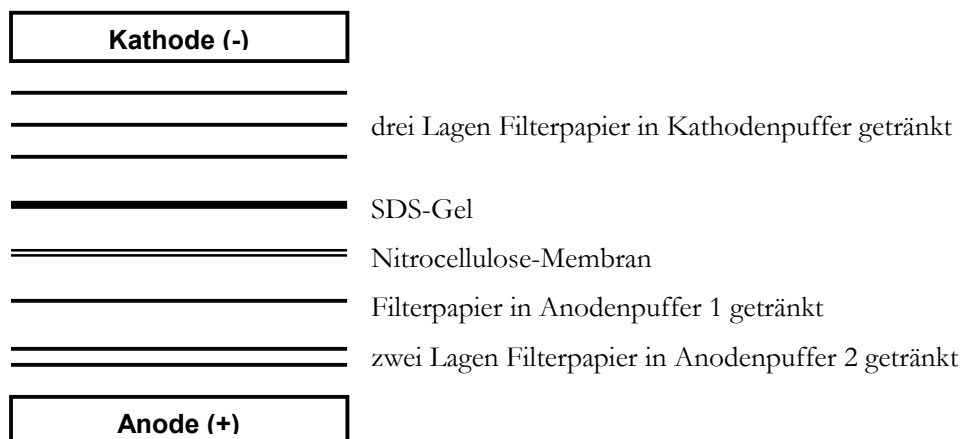


Abb. 2.5: Western Blot Apparatur

Der Transfer erfolgte für 1h bei einem Strom von 1,5 mA pro cm² Gelfläche. Die Transferapparatur wurde während des Transfers mit Wasser gekühlt. Im Anschluß an den Transfer wurde die Membran zwischen zwei Filterpapieren 10 min im Vakuum getrocknet.

Kathodenpuffer:

25 mM	Tris/HCl	pH 9,4
40 mM	Glycin	
10%	Methanol	

Anodenpuffer 1:

0,3 M	Tris/HCl	pH 10,4
10%	Methanol	

Anodenpuffer 2:

25 mM	Tris/HCl	pH 10,4
10%	Methanol	

2.11.5 Immunochemischer Nachweis

Für den immunologischen Nachweis wurde die Membran für 15 min in Blockierlösung geschwenkt und anschließend 1h mit der Antiserumlösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran zwei mal mit PBS-Lösung gewaschen, 30 min mit dem sekundären Antikörper inkubiert und erneut zwei mal mit PBS-Lösung gewaschen. Der sekundäre Antikörper war ein Anti-Rabbit Antikörper, an den eine Peroxidase gekoppelt war, die das Dianisidin der Färbelösung zu einem braunen Farbstoff umsetzt. Nach erfolgter Farbreaktion mit Reaktionslösung wurde die Membran mit Aqua bidest gewaschen, getrocknet und in PE-Folie eingeschweißt.

Antikörper:

PEPCase Antikörper aus Kaninchen, gegen PEPCase aus *Flaveria trinervia*, 1:5000 Verdünnung
Bezug: Prof. Dr. P. Westhoff, Institut f. Molekularbiologie d. Pflanzen, Düsseldorf.

Rubisco Antikörper aus Kaninchen, gegen Rubisco aus *Secale cereale*, 1:5000 Verdünnung
Bezug: Prof. Dr. J. Feierabend, Botanisches Institut d. Universität Frankfurt am Main

sekundärer anti-rabbit Antikörper aus Ziege, gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase,
1:5000 Verdünnung, Bezug: Paesel-Lorei Pharma, Nr. 5106683

Blockierlösung:

5%	Trockenmilchpulver	in PBS-Lösung
0,05%	Tween 20	

PBS-Lösung:

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
4,3 mM	Na ₂ HPO ₄
1,4, mM	K ₂ HPO ₄

Reaktionslösung:

0,02%	o-Dianisidin	in PBS Lösung
0,009%	Wasserstoffperoxid	

2.12 Metabolite

Zur Bestimmung des Malatgehaltes in den Blättern wurden je nach Blattgröße 5-6 Blattscheiben (\varnothing 1,2 cm) ausgestochen, gewogen und in einer Petrischale auf feuchtem Filterpapier für 10 min mit $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Weißlicht beleuchtet. Anschließend wurden die Blattscheiben sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und zerrieben. Das gefrorene Blattpulver wurde mit 2 ml 7%iger Perchlorsäure versetzt und bis zum Auftauen weiter gemörser. Die Neutralisation des Extraktes erfolgte mit 320 μl 5 M K_2CO_3 -Lösung; ausgefallenes KClO_4 und nicht lösliche Blattbestandteile wurden 5 min bei 13.000 rpm sedimentiert (MK 202 Kühlzentrifuge, Sigma). Der Überstand wurde abgenommen und für die enzymatische Bestimmung der C_4 -Metabolite nach LOWRY (1972) verwendet. Alle Messungen erfolgten bei 23°C und einer Wellenlänge von 340 nm (Ultraspec 200, Pharmacia) in Kunststoff-Einwegküvetten.

Reaktionsmedium zur Malatbestimmung:

50 mM	Aminopropanolpuffer	pH 10
50 mM	Glutamat	
2,5 mM	NAD	
2 U/ml	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (Boehringer Mannheim, 105554)	
2 U/ml	Malatdehydrogenase (Boehringer Mannheim, 127248)	

Reaktionsmedium zur Pyruvatbestimmung:

25 mM	Kaliumphosphatpuffer	pH 7
2,5 mM	NADH	
2 U/ml	Lactatdehydrogenase (Boehringer Mannheim, 127876)	

Reaktionsmedium zur Oxalacetat- und Phospho-enol-pyruvatbestimmung:

50 mM	Tris/HCl	pH 7,9
2,5 mM	NADH	
5 mM	K_2HCO_3	
2 U/ml	Malatdehydrogenase (Boehringer Mannheim, 127248)	
2 U/ml	Phospho- <i>enol</i> -pyruvat Carboxylase (Fluka, 79414)	

2.13 Datenerhebung und Statistik

Gaswechsellmessungen: Alle Meßwerte der Gaswechsellmessungen stellen den Mittelwert von drei aufeinander folgenden Einzelmessungen an einem Blatt dar. Es wurden pro Meßreihe mindestens je vier Kontrollpflanzen und vier gestreßte Pflanzen jeder Sorte verwendet. Jeder Punkt in den Diagrammen entspricht dabei einer Pflanze.

Chlorophyllfluoreszenz, Enzymaktivitäten, Blattdruckpotentiale: Jeder Wert ist die Einzelmessung eines Blattes, bzw. einer Pflanze. Pro Meßreihe wurden mindestens vier Kontrollpflanzen und vier gestreßte Pflanzen einer Sorte verwendet.

Chlorophyll-/Carotinoidmessung, Protein- und Metabolitbestimmung, osm. Potentiale: Die Metabolit- und Proteinbestimmung, sowie Chlorophyll- und Carotinoidmessung erfolgten jeweils als Doppel- oder Dreifachprobe. Jeder Meßpunkt stellt den Mittelwert beider (dreier) Messungen dar.

HPLC-Messungen: Bei den Messungen zur Kinetik der Deepoxidation stammen die sechs verwendeten Blattscheiben einer Zeitreihe (0-30 min) jeweils aus dem demselben Blatt. Jeder Zeitpunkt im Diagramm stellt den Mittelwert von mindestens vier voneinander unabhängigen Meßreihen (Zeitreihen, s.o.) dar.

Für die Bestimmung der Gesamtpigmentgehalte wurden die sechs Werte der Zeitreihen gemittelt. Aufgrund des unterschiedlichen Deepoxidationsgrades wurden die VAZ-Pigmente in ihrer Summe erfaßt und nicht einzeln aufgeführt. Aus jeweils vier Zeitreihen gleichbehandelter Pflanzen wurde der durchschnittliche Pigmentgehalt ermittelt.

Wenn mehr als drei Daten mit identischer Bezugsgröße ermittelt wurden, erfolgte eine Berechnung des Mittelwertes (\bar{x}) und der Standardabweichung (σ_{n-1}). War die Standardabweichung kleiner als das verwendete Symbol, wurde sie nicht zusätzlich angegeben.

Bei unterschiedlichen Bezugsgrößen der Daten (z.B. Wasserpotentiale) erfolgte die Darstellung als Punktdiagramm der Einzeldaten, ggf. wurde das Bestimmtheitsmaß (R^2) ermittelt.

Um den Bezug einzelner Datensätze zueinander darzustellen, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt und in Tabellenform dargestellt.

Auswertung und statistische Analyse erfolgten mit einem Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel, Version 7.0 und 2000).

3 Ergebnisse

3.1 Pflanzenanzucht und Streßinduktion

Zur Untersuchung der Trockenstreßtoleranz wurden in dieser Arbeit die physiologischen Parameter des Photosyntheseapparates, wie z.B. Chlorophyllfluoreszenz und Gaswechsellmessungen, ermittelt. Diese sind jedoch in starkem Maße von den gewählten Anzuchtbedingungen der Pflanzen abhängig. Schwankungen von Temperatur, Beleuchtungsstärke/-dauer oder Nährstoffversorgung können diese Parameter verändern und so die Effekte des Trockenstresses überlagern. Aus diesem Grund erfolgte die Anzucht der Pflanzen in einer Klimakammer mit nahezu gleichbleibenden klimatischen Bedingungen.

3.1.1 Charakterisierung des Bodens

Da die Zusammensetzung des Bodens besonderen Einfluß auf die Wasserverfügbarkeit der Pflanzen hat, wurde, wie bereits im zweiten Teil beschrieben, vor Versuchsbeginn eine größere Menge Boden gemischt, um Schwankungen der Wasser und Nährstoffverfügbarkeit des Anzuchtsubstrats zu vermeiden. Um Homogenität und Eigenschaften des gemischten Bodens zu überprüfen, wurden aus fünf verschiedenen Fässern Erdproben genommen und der maximale Wassergehalt, sowie der Wassergehalt bei pF 4,2 ermittelt. Aus dem Vergleich dieser Daten mit Wasserspannungskurven standardisierter Bodentypen läßt sich eine Abschätzung der Bodeneigenschaften treffen. Die Untersuchung der Wassergehalte der Bodenproben bei pF 4,2 und bei Wassersättigung zeigen für alle 5 Proben relativ ähnliche Werte (Abb. 3.1):

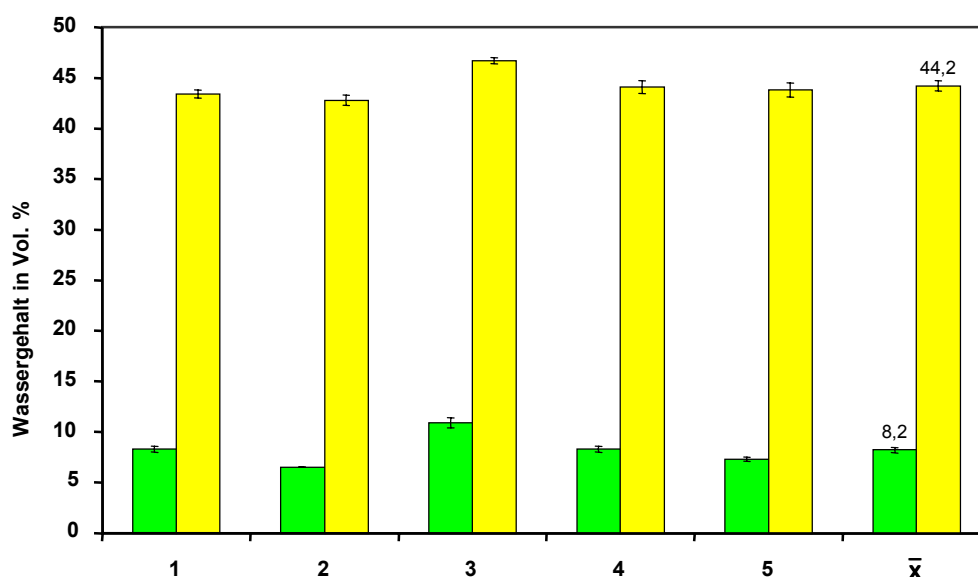


Abb. 3.1: Wassergehalte der Bodenproben bei Wassersättigung (gelb) und pF 4,2 (grün).

Der Wassergehalt bei pF 4,2 schwankte zwischen 6,5 und 10,2 Vol.%, der Gehalt bei Wassersättigung liegt zwischen 42,8 und 46,7 Vol.%. Im Mittel ergaben sich Werte von 8,2 Vol.% für pF 4,2 und 44,2 Vol.% für den wassergesättigten Boden. Diese Werte entsprachen in etwa dem Schluffboden aus Abb. 3.2:

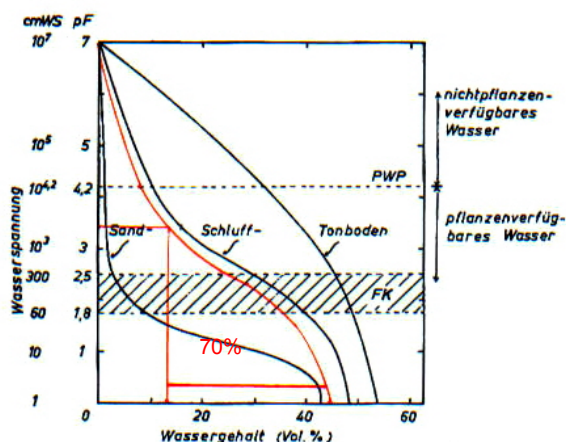


Abb. 3.2: Beziehung zwischen Wassergehalt und Wasserspannung unterschiedlicher Bodentypen (FK = Feldkapazität, PWP = permanenter Welkepunkt). Verändert aus: Scheffer/Schachtschnabel "Lehrbuch der Bodenkunde".

Konstruiert man aus diesen beiden Daten eine hypothetische Wasserspannungskurve (rot), so bedeutet der 70%ige Wasserverlust des Gesamtwassergehaltes im Verlauf eines Trockenstreuversuchs einen Bodenwassergehalt von ca. 13 Vol.% zu Streßbeginn. Dieser Wassergehalt entspricht in etwa einer Wasserspannung von pF 3,4 und einem Bodenpotential von -2,5 bar. Während der 24stündigen Streßperiode verloren die Böden bis zur nächsten Bewässerung etwa weitere 5-8% ihres Gesamtwassergehaltes. Dadurch fiel der Bodenwassergehalt bis unter 10 Vol.%, womit der permanente Welkepunkt, der für meisten Kulturpflanzen per Definition bei pF 4,2 = -15,8 bar liegt, unterschritten wurde. Da der Wassergehalt der Anzuchtgefäße immer wieder auf 30% des Gesamtwassergehaltes aufgefüllt wurde, war der Trockenstreß während des Versuchs deshalb nicht konstant, sondern schwankte zwischen ca. -2,5 und -18 bar Wasserpotential des Bodens. Das zeigte sich auch in den gemessenen Blattdruckpotentialen der gestreßten Versuchspflanzen, die zwischen -8 und -20 bar lagen.

3.1.2 Quantifizierung des Trockenstresses

Aufgrund des heterogenen Bodenwasserpotentials war es notwendig, den Trockenstreßzustand der Versuchspflanzen direkt zu quantifizieren. Zu diesem Zweck wurden mit dem Blattdruckpotential, dem osmotischen Potential und dem Wassersättigungsdefizit drei verschiedene Meßgrößen erfaßt, durch die sich der Wasserhaushalt der Pflanze beschreiben läßt. Diese wurden miteinander verglichen um die beste Methode für die späteren Versuche zu ermitteln. Der Vergleich der osmotischen Potentiale der Blattpreßsäfte und der Blattdruckpotentiale (Abb. 3.3) zeigt, daß das Blattdruckpotential der Kontrollpflanzen (-2 bis -4 bar) aufgrund des herrschenden Turgors wesentlich höher war als das osmotische Potential (-8 bis -10 bar). Daraus läßt sich für die Kontrollpflanzen ein Turgor von etwa 6 bar ableiten. Bei den gestreßten Pflanzen sank der Turgor, wodurch das Blattdruckpotential zunehmend

durch das osmotische Potential bestimmt wurde. Bei einem Blattdruckpotential von ca. -12 bar lag kein Turgor mehr vor, das Blattdruckpotential wurde allein durch das osmotische Potential gebildet, symbolisiert durch die unterbrochene Linie im Diagramm. Die bei diesem Versuch ermittelten Daten für die beiden Kultivare E 36 und B 35 entsprachen dabei den von WRIGHT et al. (1983) ermittelten Daten für zwei weitere *Sorghum*-Sorten (E 57; TX 671).

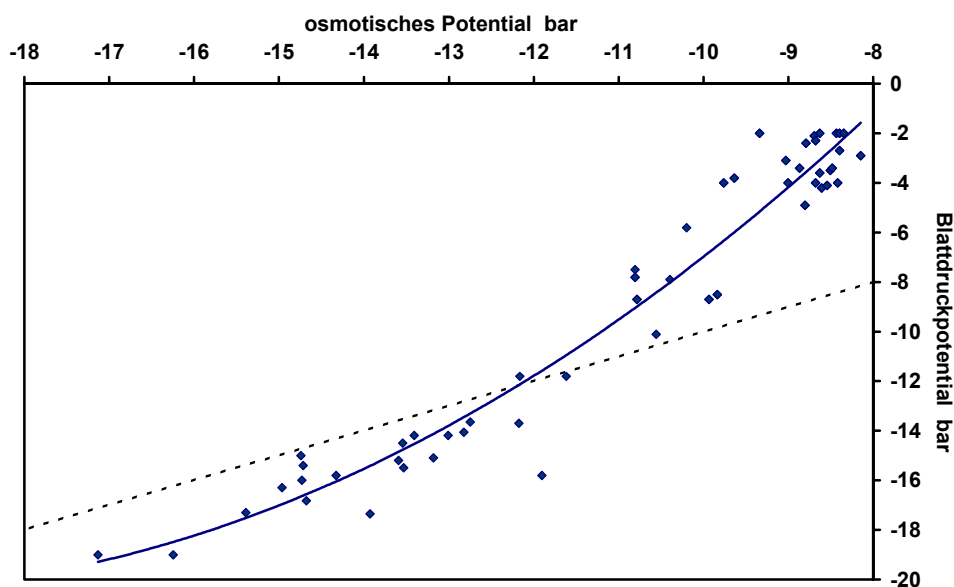


Abb. 3.3: Beziehung zwischen Blattdruckpotential und osmotischem Potential; unterbrochene Linie: Isobare von osmotischem Potential und Blattdruckpotential.

Der Vergleich des prozentualen Wassersättigungsdefizits (WSD) und des Blattdruckpotentials der Versuchspflanzen zeigt (Abb. 3.4), daß das WSD bei gleichem Blattdruckpotential der Pflanzen beträchtliche Schwankungen aufweist.

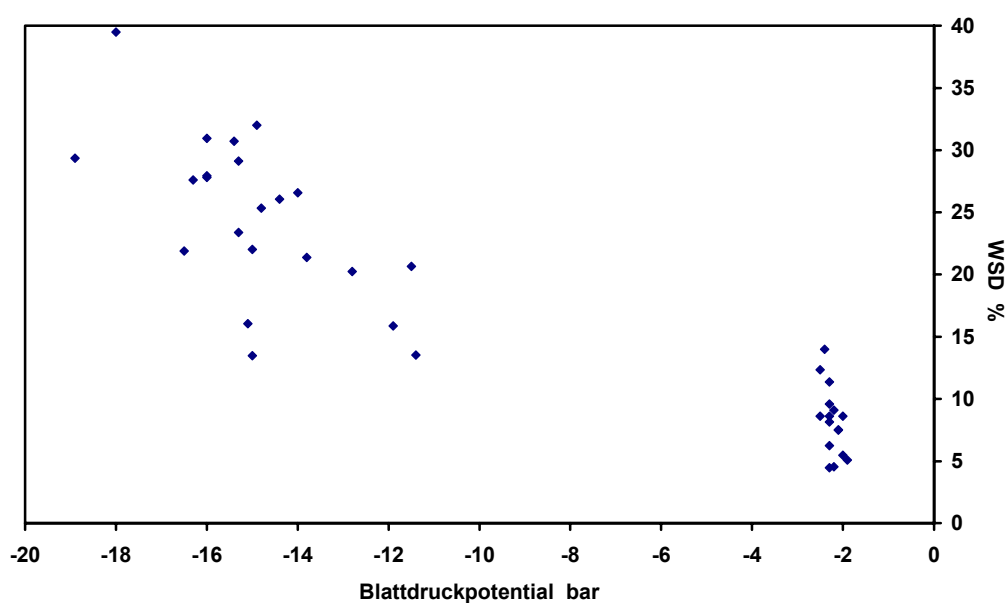


Abb. 3.4: Beziehung zwischen Blattdruckpotential und Wassersättigungsdefizit.

Das WSD der Kontrollpflanzen (ca. -2 bar Blattdruckpotential) schwankte zwischen 5 und 10%, bei den gestreßten Pflanzen gleichen Blattdruckpotentials (z.B. -15 bar) lagen die Schwankungen sogar zwischen 13 und 32%. Aufgrund der starken Streuungen und der aufwendigen Bestimmung, wurde in den weiterführenden Versuchen auf die Bestimmung des WSD als interner Standard für den Trockenstreß verzichtet.

Zwischen osmotischem Potential und Blattdruckpotential besteht eine hohe Korrelation und beide Meßmethoden geben ein gutes Maß für den Zustand des pflanzlichen Wasserhaushalts. Aufgrund der schnelleren und technisch einfacheren Verfahrens wurde für die weiterführenden Versuche jedoch nur noch das Blattdruckpotential mittels der Druckkammermethode bestimmt.

3.2 Vorversuche zur Auswahl und Charakterisierung geeigneter Kultivare

3.2.1 Gaswechsellmessungen an verschiedenen *Sorghum bicolor*-Kultivaren

Die zum Vergleich der Trockentoleranz ermittelten Photosyntheseraten sind u.a. stark lichtabhängig. Um möglichst große Unterschiede zwischen den einzelnen Kultivaren bestimmen zu können, sollte die Photosynthese wenn möglich bei Lichtsättigung bestimmt werden. Als Lichtsättigungspunkt für C₄-Pflanzen werden in der Literatur Werte von über 2000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angegeben (LARCHER, 1994). Da die verwendeten Versuchspflanzen nur bei einer verhältnismäßig schwachen Lichtintensität von ca. 400 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kultiviert wurden, war es notwendig, den Lichtsättigungspunkt der Versuchspflanzen zu bestimmen. Dazu wurde die Photosyntheserate verschiedener Kultivare in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke gemessen (Abb. 3.5).

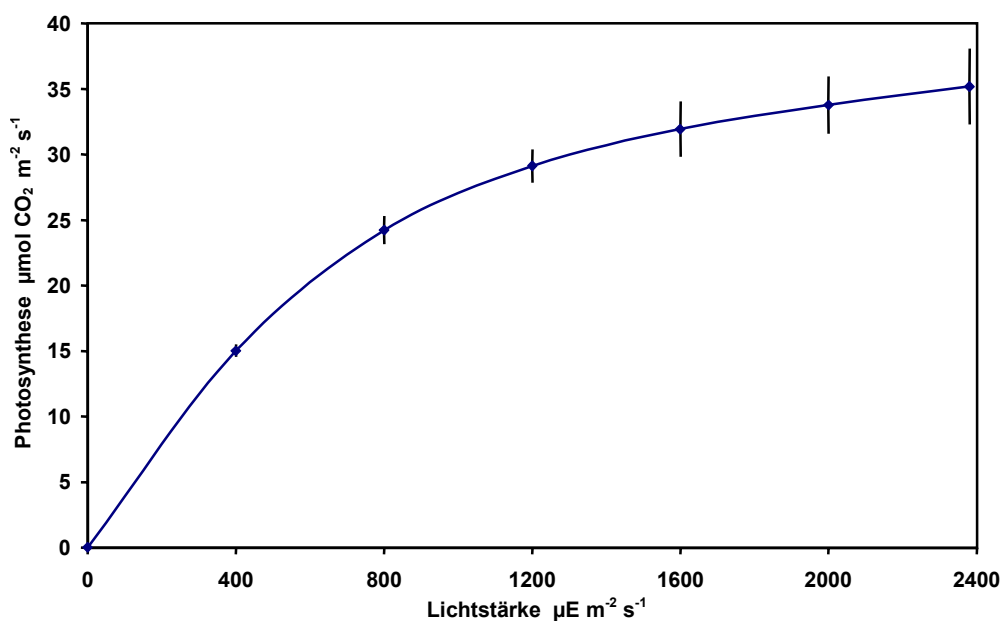


Abb. 3.5: Lichtabhängigkeit der Photosynthese

Man erkennt bis zu einer Beleuchtungsstärke von $2400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ keine Lichtsättigung der Photosynthese. Die Anzucht der Pflanzen unter wesentlich schwächerem Licht als unter natürlichen Bedingungen führte also nicht zu einem niedrigeren Lichtsättigungspunkt des Photosyntheseapparats. Da es durch die hohen Beleuchtungsstärken jedoch zu einer starken Erwärmung der Meßküvette kam, erfolgten alle weiteren Gaswechsellmessungen bei $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, wodurch zu hohe Temperaturen, die möglicherweise die Photosyntheserate beeinflussen könnten, vermieden wurden.

Zur Bestimmung der trockenolerantesten und trockenempfindlichsten Kultivare wurden die Photosyntheseraten und die Blattdruckpotentiale von sechs verschiedenen Sorten (E 36; R 16; CSV 5; TX 7078; IS 22380; B 35) unter Kontrollbedingungen und Trockenstreß gemessen (Abb. 3.6).

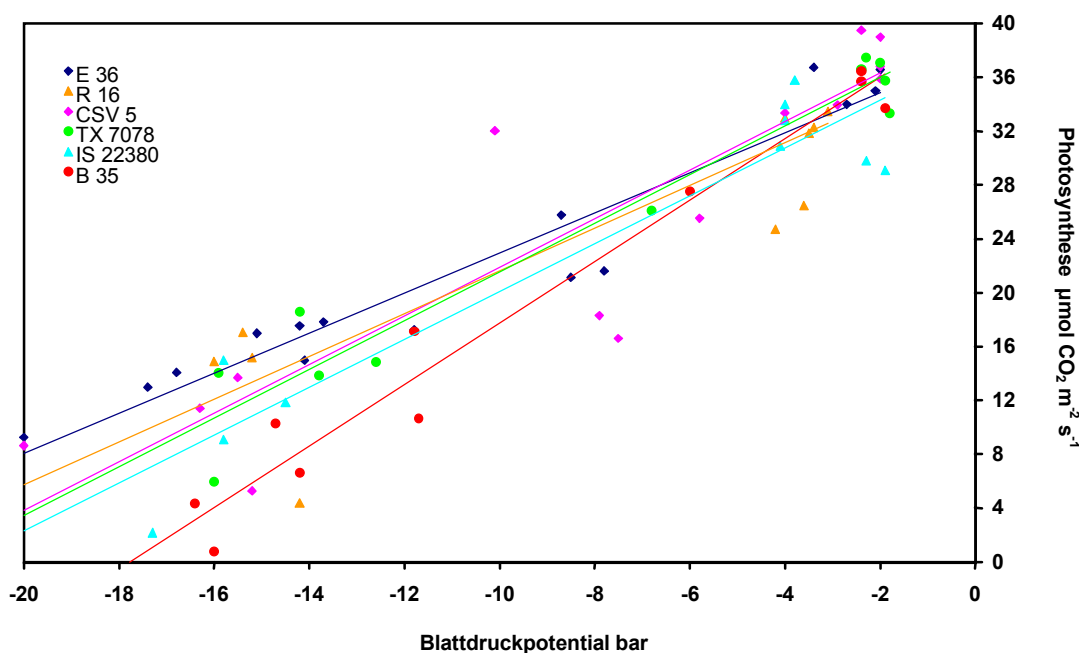


Abb. 3.6 Photosyntheseraten verschiedener Sorghum-Kultivare in Abhängigkeit vom Blattdruckpotential

Alle Sorten zeigten unter Kontrollbedingungen relativ ähnliche, durchschnittliche Photosyntheseraten von $32\text{--}36 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei Blattdruckpotentialen von -2 bis -4 bar. Unter Trockenstreß sank die Photosyntheserate bei allen Kultivaren, es ergibt sich folgende Reihenfolge: $\text{E 36} > \text{R 16} > \text{CSV 5} > \text{TX 7078} > \text{IS 22380} > \text{B 35}$. Aufgrund der hohen Signifikanz der Trendlinien (alle Bestimmtheitsmaße, $R^2 > 0,8$), wurden für die weiteren Versuche die Kultivare E 36 als streßtolerante und B 35 als streßempfindliche Sorte ausgewählt.

3.2.2 Blattschäden

Neben den unterschiedlichen Photosyntheseraten kam es infolge des Wassermangels zu Blattschäden, die bis zum Absterben ganzer Blätter führen konnten. Dabei zeigte die als trocken tolerant klassifizierte Sorte E 36 wesentlich stärkere Schädigungen als B 35, wovon insbesondere die älteren Blätter und die Blattspitzen betroffen waren (siehe. Abb. 3.7).

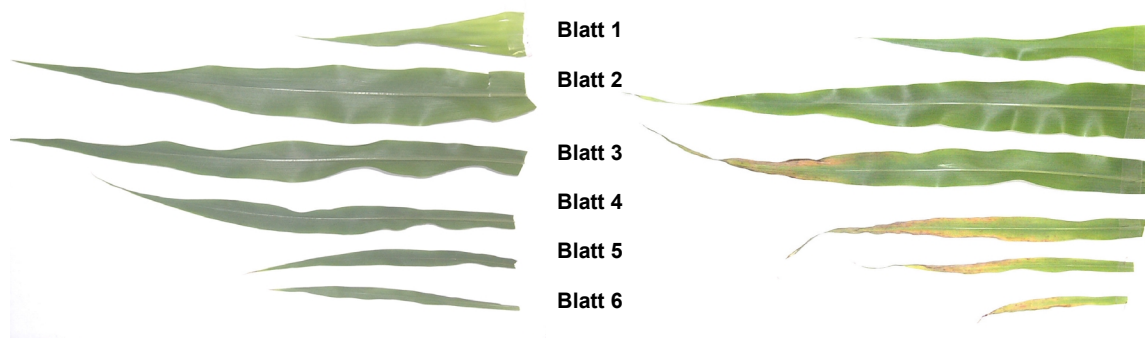
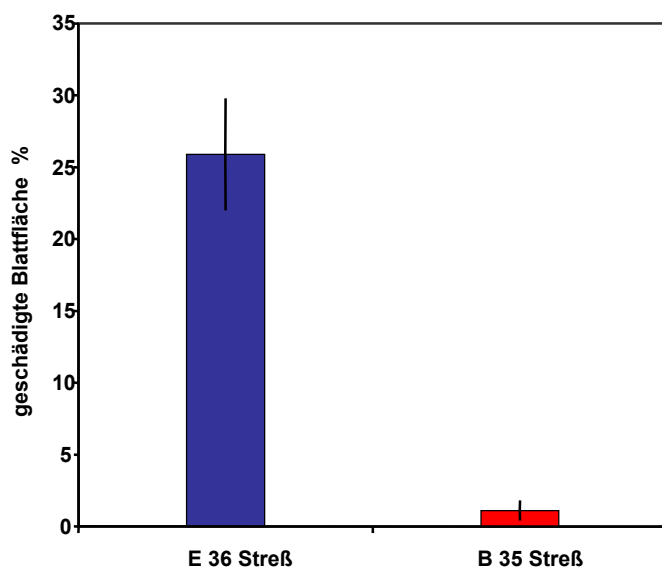


Abb. 3.7: Blattschäden nach Trockenstreß, linke Seite B 35, rechte Seite E 36.



Quantifiziert man die Schäden (Abb. 3.12) so lag der Verlust an Blattfläche nach der Streßperiode bei E 36 mit ca. 25% geschädigter oder abgestorbener Blattfläche deutlich höher als bei B 35, die im gleichen Zeitraum nur etwa 1% ihrer Blattfläche verloren. Trotz der Blattschäden bei E 36 zeigten die ungeschädigten Bereiche der Blätter im Vergleich zur Sorte B 35 höhere Photosyntheseleistungen (Abb. 3.12).

Abb. 3.8: Quantifizierung der geschädigten Blattfläche

3.2.3 Transpirationsmessungen

Neben den Blattschäden wurde an den in 3.2.2 beschriebenen Pflanzen auch die Gesamttranspiration pro Tag ermittelt und auf die Gesamtblattfläche (Abb. 3.9), bzw. intakte Blattfläche (s.u.) bezogen.

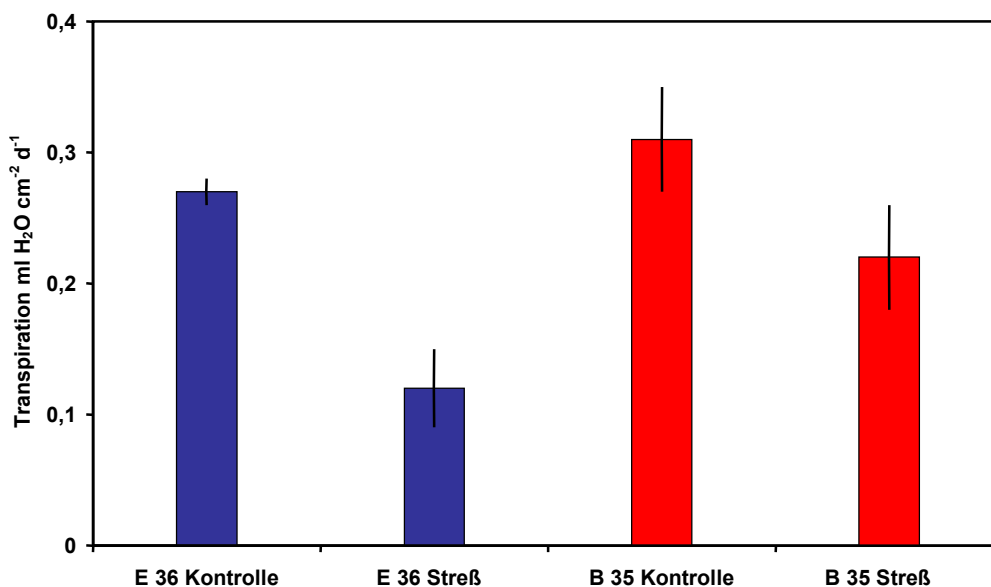


Abb. 3.9: Blattflächenbezogene Transpirationsraten pro Tag.

Unter Kontrollbedingungen transpierten beide Sorten mit 0,27 ml (E 36), bzw. 0,31 ml (B 35) $\text{H}_2\text{O cm}^{-2}$ etwa gleich viel Wasser pro Tag und Fläche. Trockenstreß bewirkt das Schließen der Stomata, wodurch es zu einer Einschränkung der Transpiration kam. Dabei sank die Transpirationsrate bei E 36 um ca. die Hälfte auf 0,13 $\text{ml H}_2\text{O cm}^{-2}$, wohingegen die Transpiration in den trockengestreßten B 35 Pflanzen nur um etwa 1/3, auf 0,21 $\text{ml H}_2\text{O cm}^{-2}$ reduziert wurde.

Zu berücksichtigen ist dabei jedoch, daß in dieser Auswertung die Gesamtblattfläche als Grundlage der Berechnung verwendet wurde. Diese war jedoch im Fall der Sorte E 36 zu etwa 25% stark geschädigt, bzw. abgestorben war und trug nicht mehr zur Transpiration bei. Legt man zur Berechnung der Transpirationsrate die intakte Blattfläche zugrunde, lag die Transpiration pro Tag in den gestreßten E 36 Pflanzen bei durchschnittlich etwa 0,17 $\text{ml H}_2\text{O cm}^{-2}$ und damit nur geringfügig unter denen der Sorte B 35.

Um herauszufinden, ob die unterschiedlichen Transpirationsraten beider Sorten eventuell auf unterschiedlicher Anzahl von Spaltöffnungen pro Blattfläche beruhen, wurden von der Epidermis der Blattober- und Unterseiten mit Nagellack Abdrücke gefertigt und unter dem Lichtmikroskop fotografiert (Abb. 3.10). Man erkennt die typischen Epidermiszellen mit Stomata des Gramineen-Typs und Leitbündelstrukturen. Anhand der Bilder wurde die Zahl der Stomata pro mm^2 ermittelt (Abb. 3.11):

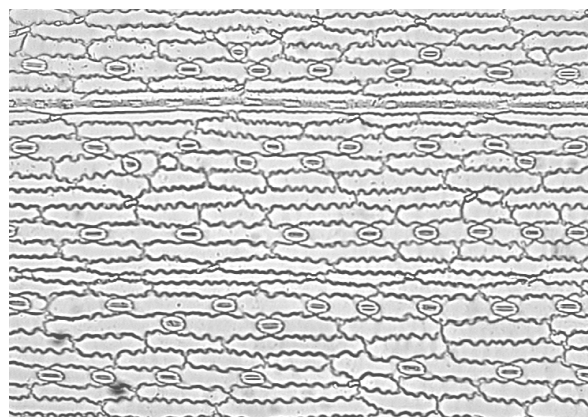


Abb. 3.10: Blattunterseite B 35, Epidermis mit Stomata.

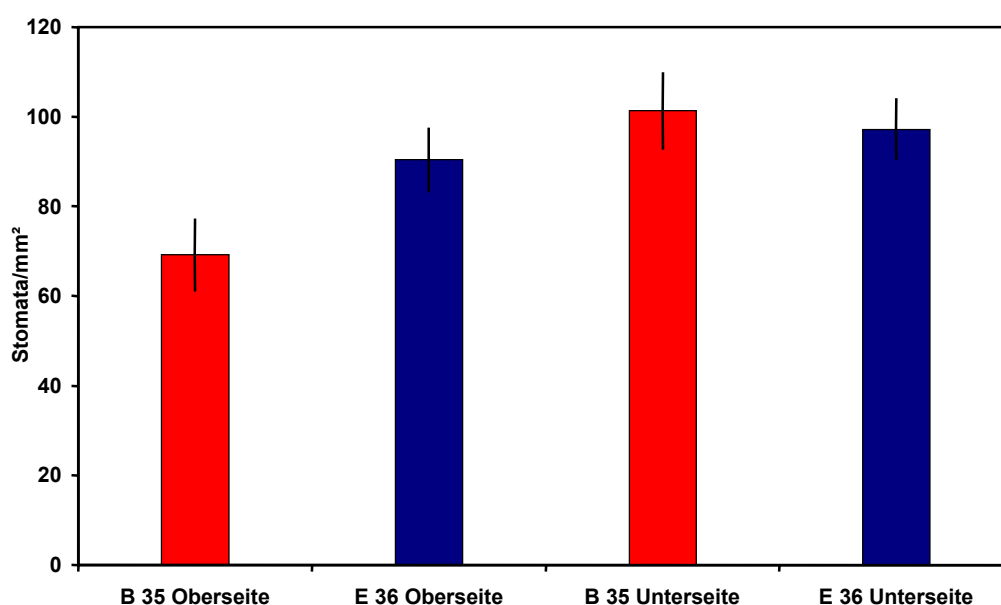


Abb. 3.11: Stomata pro Blattfläche

Ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Stomata pro Blattfläche, durch den die unterschiedlichen Transpirationsraten begründet werden könnten, war nicht zu erkennen. Die mittlere Anzahl der Stomata war bei beiden Sorten gleich, lediglich in der Verteilung auf Ober- und Unterseite scheint es geringfügige Unterschiede zwischen beiden Sorten zu geben. Während bei E 36 die Stomata nahezu gleichmäßig auf Ober- und Unterseite verteilt waren, befand sich bei der Sorte B 35 ein etwas größerer Anteil der Stomata auf der Blattunterseite.

3.2.4 Gaswechselformung an allen Blättern der Sorghum-Kultivare E 36 und B 35

Zur genaueren Charakterisierung der beiden Kultivare wurden die Photosyntheseraten der ungeschädigten Blattflächen in Abhängigkeit vom Blattdruckpotential an allen voll entwickelten Blättern von drei Wochen alten Pflanzen bestimmt (Abb. 3.12). In diesem Entwicklungsstadium besitzen die Pflanzen fünf Blätter. Bei der im folgenden verwendeten Zählweise ist Blatt 2 dabei das jüngste voll entwickelte Blatt, Blatt 5 das älteste. Bei den in diesem Versuch verwendeten Pflanzen weisen die gestreßten Pflanzen der Sorte E 36 im Mittel niedrigere Blattdruckpotentiale auf als B 35.

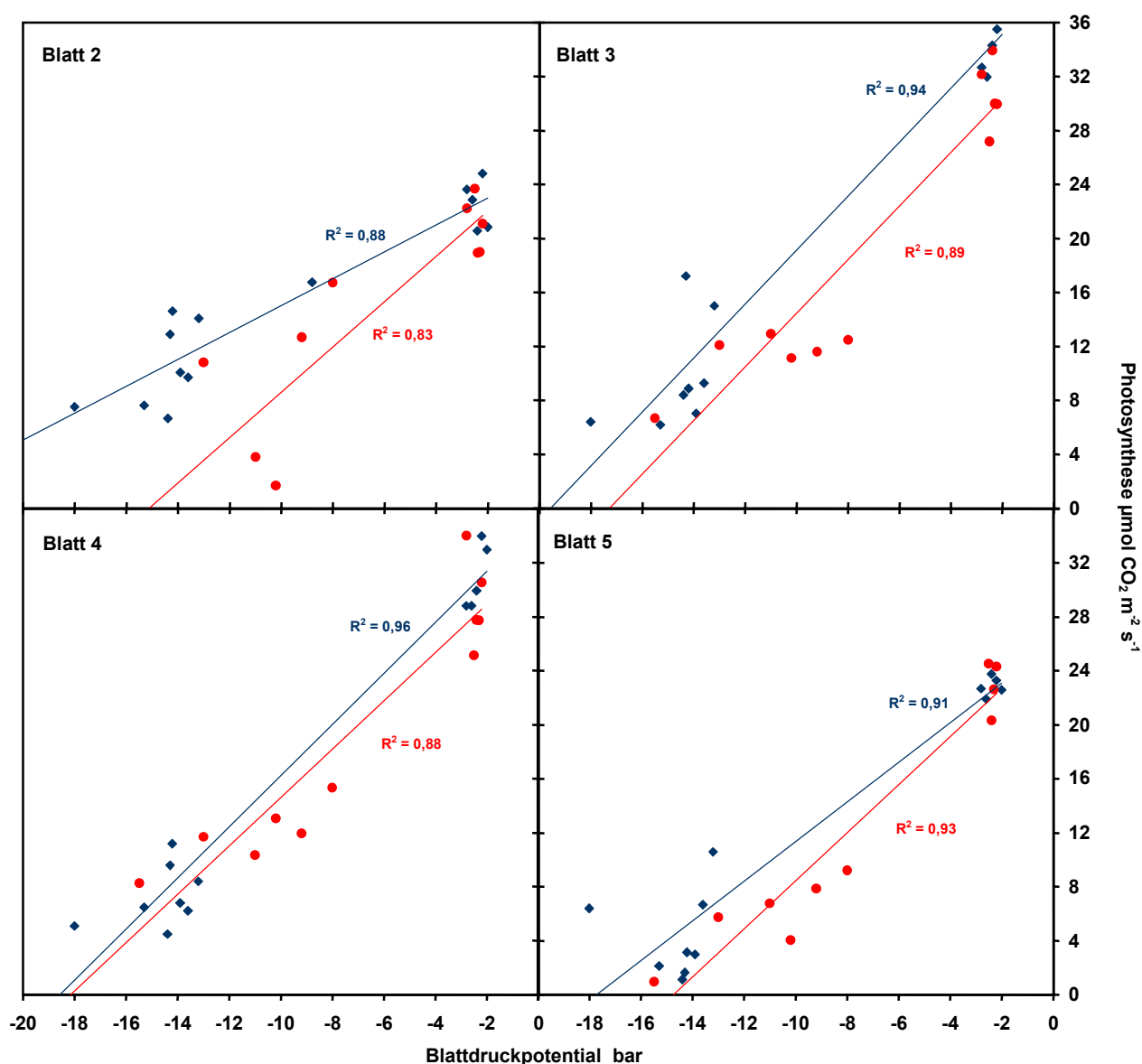


Abb. 3.12: Photosyntheseleistung in Abhängigkeit des Entwicklungszustands und des Blattdruckpotentials.
Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Ein Vergleich der Daten der Kontrollpflanzen zeigte deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Blättern. Sowohl die alten Blätter (5) als auch die neuen Blätter (2) hatten mit Photosyntheseraten von ca.

24 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ eine deutlich niedrigere Photosyntheserate als die mittleren Blätter (3; 4) mit Raten um durchschnittlich 32 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kultivaren war bei den Kontrollpflanzen nicht zu erkennen

Unter Trockenstreß ging die Photosyntheseleistung beider Kultivare stark zurück, wobei sich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Blättern, aber auch zwischen den beiden Kultivaren feststellen ließen. Wie bei den Kontrollpflanzen, zeigten die ältesten Blätter die geringste Photosynthese. Die ermittelten Raten lagen bei ca. 4 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Die Photosynthese des vierten Blattes lag bei gleichem Streß ca. 2-3 mal höher als bei Blatt 5, ein signifikanter Unterschied zwischen den Kultivaren ist nicht zu erkennen. Bei dem dritten Blatt zeigte die Sorte B 35 nahezu identische Photosyntheseraten wie in Blatt 4, wohingegen die Raten im dritten Blatt von E 36 im Vergleich über denen von B 35 lagen. Damit erreichten unter Streß beide Kultivare im dritten Blatt mittlere PS-Raten von ca. 12 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, wobei die niedrigeren Blattdruckpotentiale von E 36 zu berücksichtigen sind. Der deutlichste Unterschied zwischen den beiden Kultivaren zeigte sich bei den jüngsten Blättern. Während die jüngsten Blätter der Sorte E 36 mit durchschnittlich 15 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, die höchsten PS-Raten dieser Sorte unter Streß aufwiesen, lagen im Gegensatz dazu die mittleren PS-Raten von B 35 mit ca. 8 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ um etwa die Hälfte niedriger.

3.2.5 F_v/F_m -Verhältnis

Der Quotient von variabler- und maximaler Fluoreszenz (F_v/F_m), der Chl.-a-Fluoreszenz-Messungen beschreibt die theoretisch maximale photochemische Effizienz des Photosystems II im dunkeladaptierten Zustand (BUTLER und KITAJIMA, 1975). Daraus lassen sich Rückschlüsse über den Zustand anderer Komponenten und Reaktionen von Elektronentransportkette und Calvin-Zyklus ziehen, wodurch diese Parameter ein probates Mittel zur Überprüfung des physiologischen Zustandes des Photosyntheseapparates darstellt. Für eine Vielzahl höherer Pflanzen wurden bei optimaler PS II-Effizienz F_v/F_m -Werte von 0,81 und 0,83 bestimmt (DEMMIG und BJÖRKMANN, 1987).

Vergleicht man den F_v/F_m -Wert der einzelnen Blätter beider Kultivare unter Kontroll- und Streßbedingungen miteinander (Abb. 3.13), ergibt sich bei den Kontrollpflanzen ein ähnliches Bild wie bei den Photosynthesemessungen. Alle Blätter erreichten F_v/F_m -Werte von 0,75 - 0,8. Unterschiede zwischen beiden Sorten bestehen nicht.

Unter Streßbedingungen sank das F_v/F_m -Verhältnis in allen Pflanzen, es bestand jedoch eine erhebliche Streuung, wodurch sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Kultivaren erkennen ließen. Insgesamt wiesen die älteren Blätter durchschnittlich etwas niedrigere F_v/F_m -Werte auf als die jüngeren Blätter, was auf etwas höheren Streß in den älteren Blättern hindeutet. Dies korreliert auch mit den geringen Photosyntheseraten der alten Blätter.

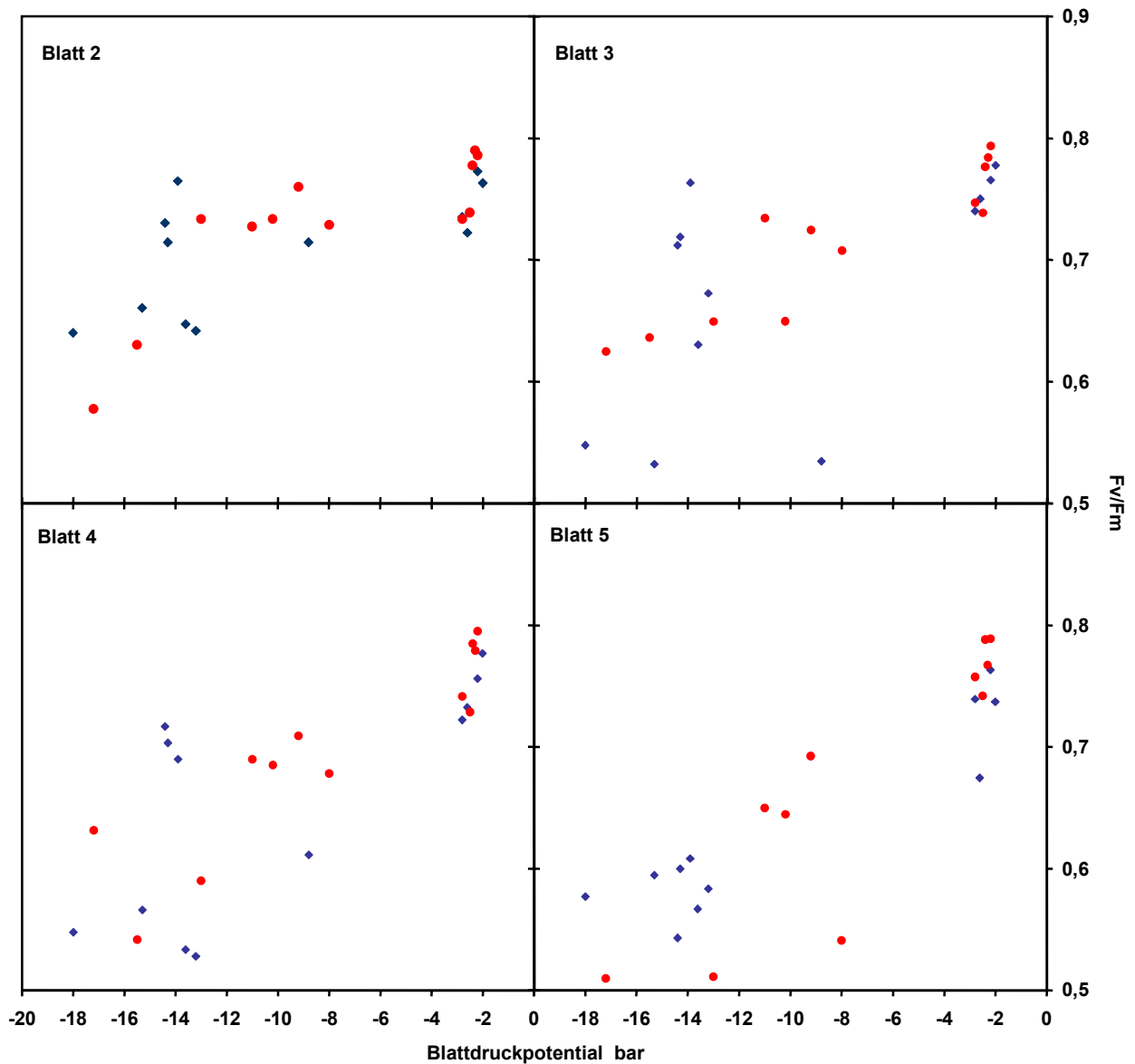


Abb. 3.13: F_v/F_m -Verhältnis in Abhängigkeit des Entwicklungszustands und des Blattdruckpotentials.
Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

3.2.6 Pigmentgehalt

Chlorophyll

Im Gegensatz zu den F_v/F_m -Werten, zeigten sich bei den blattflächenbezogenen Chlorophyllgehalten (Abb. 3.14) bereits in den Kontrollpflanzen erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Blättern und Kultivaren.

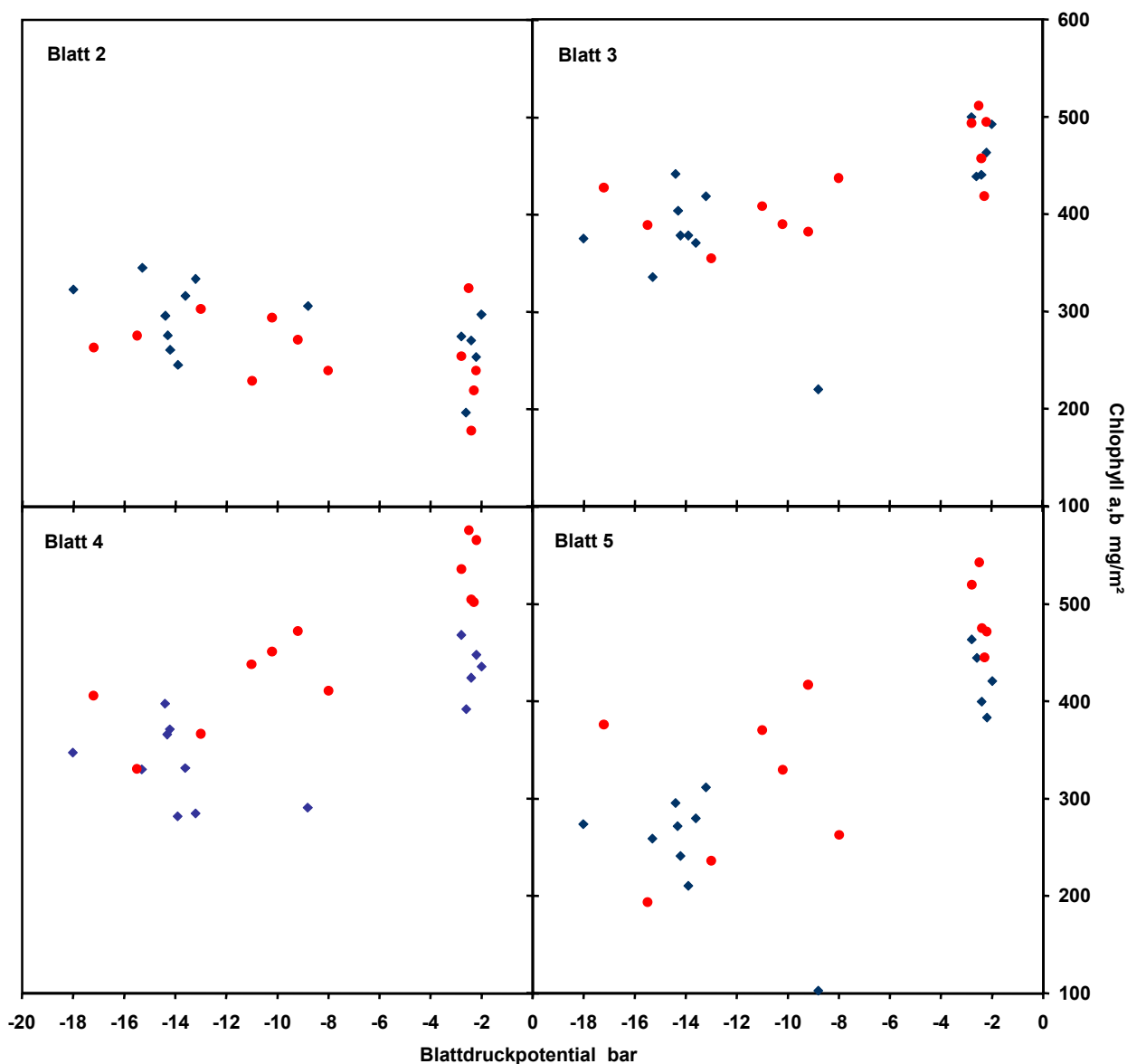


Abb. 3.14: Chlorophyllgehalt pro Blattfläche in Abhängigkeit des Entwicklungszustands und des Blattdruckpotentials. Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Bei den Kontrollpflanzen der Sorte E 36 lagen die Werte der drei älteren Blätter mit jeweils ca. 450 mg/m² auf ähnlichem Niveau, wohingegen das jüngste Blatt nur etwa die Hälfte dieses Wertes aufwies. Bei den Blättern der Sorte B 35 lagen die Chlorophyllgehalte in den älteren Blättern tendenziell etwas höher als bei den Blättern von E 36, insbesondere bei dem vierten Blatt. Wie bei der Sorte E 36 wies auch hier das jüngste Blatt den geringsten Chlorophyllgehalt auf. Möglicherweise war dieser verantwortlich für die

relativ geringe Photosyntheserate der jungen Blätter bei den Kontrollpflanzen (siehe. Abb. 3.12). Durch den Trockenstreß kam es in beiden Kultivaren zu einem Verlust von Chlorophyll, insbesondere in den älteren Blättern. Im fünften Blatt sank der durchschnittliche Gehalt um ca. 50%, in Blatt 4 um etwa 30% und im dritten Blatt um nur noch ca. 15%. Im Gegensatz dazu blieb der Chlorophyllgehalt des jüngsten Blattes während der Streßperiode nahezu unverändert. Ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Sorten ist mit Ausnahme der Kontrollen bei Blatt 4 nicht zu erkennen. Eine Einschränkung der Photosynthese in den trockengestreßten älteren Blättern allein aufgrund des sinkenden Chlorophyllgehaltes kann ausgeschlossen werden, da die jüngsten Blätter der Kontrollpflanzen mit geringerem Chlorophyllgehalt höhere Photosyntheseraten realisieren.

Carotinoide

Den Gehalt der Gesamcarotinoide pro Blattfläche zeigt Abbildung 3.15.

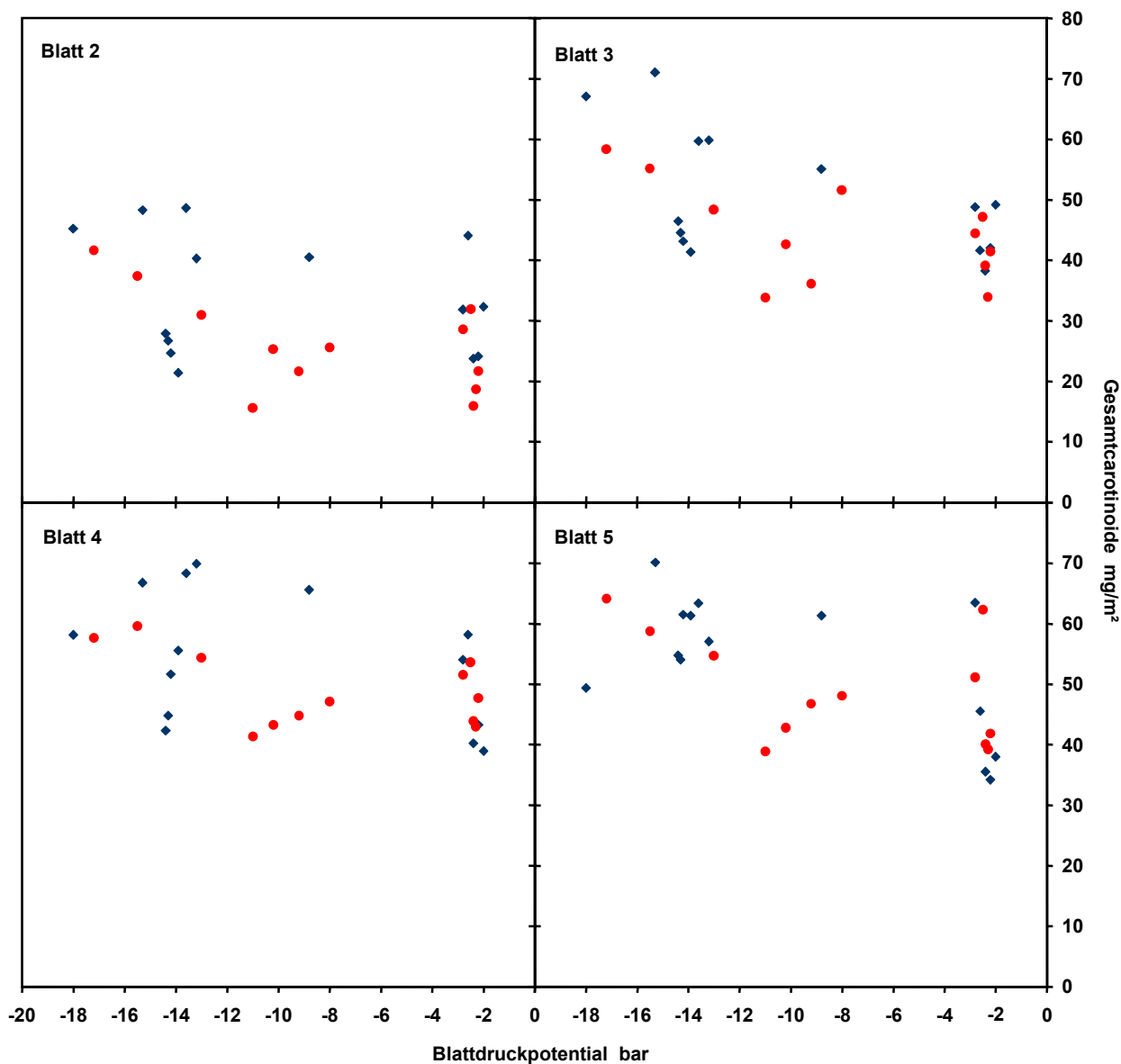


Abb. 3.15: Carotinoidgehalt pro Blattfläche in Abhängigkeit des Entwicklungszustands und des Blattdruckpotentials. Rote Symbole: B 35, blaue Symbole: E 36.

Wie bei den Chlorophyllen war auch der Carotinoidgehalt in den älteren Blättern höher als in den jüngeren Blättern, die nur etwa die Hälfte des Carotinoidgehaltes der älteren Blätter aufwiesen. Im Gegensatz zu den Chlorophyllen kam es jedoch nicht zu einem Pigmentverlust in den Blättern unter Trockenstreß. Es schien im Gegenteil zu einem leichten Anstieg des Carotinoidgehaltes zu kommen, was aufgrund der großen Streuung der Meßpunkte jedoch statistisch nicht gesichert ist. Insgesamt machten die Carotinoide nach der spektralphotometrischen Meßmethode ungefähr 10% der Gesamtpigmente aus. Vergleicht man die Verhältnisse von Chlorophyll a zu Chlorophyll b und das Carotinoid/Chlorophyll - Verhältnis (Tab. 3.1), erkennt man Veränderungen, die abhängig waren von Streß und Entwicklungszustand der Blätter.

Blatt	Pflanze	Chl. a/b Kontrolle	Chl. a/b Streß	Car./Chl. Kontrolle	Car./Chl. Streß
2	E 36	4,06 ± 0,12	3,82 ± 0,42	0,13 ± 0,06	0,12 ± 0,02
	B 35	4,40 ± 0,33	4,26 ± 0,83	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,03
3	E 36	3,87 ± 0,12	3,52 ± 0,41	0,09 ± 0,01	0,15 ± 0,05
	B 35	4,11 ± 0,11	3,83 ± 0,52	0,09 ± 0,00	0,12 ± 0,02
4	E 36	3,67 ± 0,16	3,49 ± 0,29	0,11 ± 0,02	0,18 ± 0,05
	B 35	4,01 ± 0,17	3,70 ± 0,42	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,03
5	E 36	3,87 ± 0,09	3,46 ± 0,16	0,10 ± 0,02	0,27 ± 0,13
	B 35	3,89 ± 0,18	3,53 ± 0,55	0,09 ± 0,01	0,18 ± 0,07

Tab. 3.1: Chl. a/b und Chl./Car.-Verhältnis von Kontrollpflanzen und gestreßten Pflanzen.

Die teilweise hohen Standardabweichungen der Chl.a/b und Car./Chl.-Verhältnisse machen statistisch gesicherte Aussagen schwierig. Trotzdem lassen sich einige interessante Trends feststellen. Betrachtet man das Chl. a/b-Verhältnis der Kontrollpflanzen, scheint der Chl. a Anteil in den jüngeren Blättern höher als in den älteren Blättern, insgesamt besaß die Sorte B 35 vor allem in den jüngeren Blättern ein höheres Chl. a/b-Verhältnis als E 36. Trockenstreß führte nicht nur zu einem Verlust von Chlorophyll (Abb. 3.14), sondern auch zu einer Verschiebung des Chl. a/b-Verhältnisses. In allen Blättern war der Chl. a-Anteil unter Streß geringer als in den jeweiligen Kontrollen. Auch bei den gestreßten Pflanzen war der Chl. a-Anteil in der Sorte E 36 etwas kleiner als in B 35.

Das Verhältnis von Carotinoiden zu Gesamtchlorophyll war, im Rahmen der Standardabweichung, in allen Blättern der Kontrollpflanzen gleich, Unterschiede zwischen den beiden Kultivaren bestanden nicht,

der Anteil der Carotinoide betrug in den Kontrollpflanzen etwa 10%. Unter Trockenstreß stieg das Car./Chl.-Verhältnis, was aufgrund der sinkenden Chlorophyllgehalte (Abb. 3.14) und der konstanten, bzw. leicht steigenden Carotinoidgehalte (Abb. 3.15) zu erwarten war. Insbesondere in den alten Blättern mit starkem Chlorophyllverlust stieg das Car./Chl.-Verhältnis etwa um das zwei- (B 35), bzw. dreifache (E 36) an. Insgesamt schien das Car./Chl.-Verhältnis der gestreßten Pflanzen in der Sorte E 36 etwas höher zu liegen als in B 35.

3.3 Weiterführende Untersuchungen am jüngsten voll entwickelten Blatt

3.3.1 Gaswechsellmessungen

Photosynthese

Da sich in den Vorversuchen die größten Unterschiede zwischen den beiden Kultivaren bei den Messungen am jüngsten voll entwickelten Blatt zeigten, wurden alle weiteren Untersuchungen an diesem Blatt durchgeführt. Um die bei den Vorversuchen erhaltenen Ergebnisse der Gaswechsellmessungen zu überprüfen, erfolgten weitere Messungen am zweiten Blatt (Abb. 3.16):

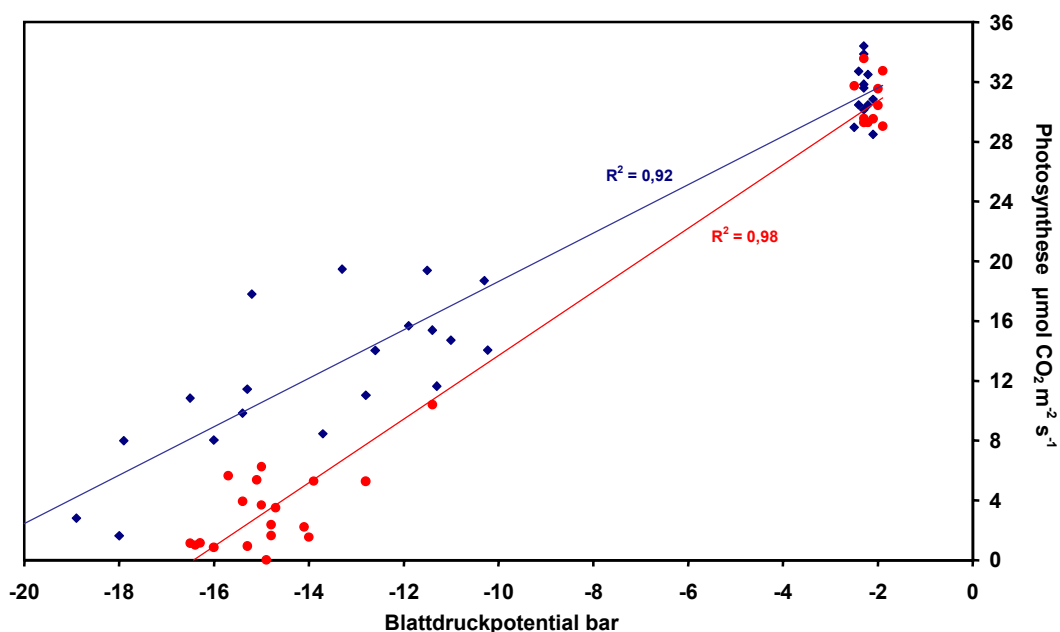


Abb. 3.16: Photosyntheseraten in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Dabei ergab sich ein ähnliches Bild wie bei den Vorversuchen. Die Photosyntheseraten der Kontrollpflanzen lagen zwischen 28 und 35 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ und zeigten keine Unterschiede zwischen beiden Sorten. Die trockengestreßten Pflanzen unterschieden sich hinsichtlich ihrer Photosyntheseleistung unter Streß deutlich voneinander. Bei einem Blattdruckpotential von -15 bar, lag die mittlere Photosyntheserate der Sorte E 36 bei ca. 11 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, wohingegen die Sorte B 35 nur noch eine mittlere Photosyntheserate von ca. 4 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ aufwies. Stärker als -17 bar gestreßte B 35 Pflanzen

zeigten keine meßbare Photosyntheserate mehr. Beide Regressionsgeraden weisen ein höheres Bestimmtheitsmaß (E 36: 0,92; B 35: 0,98) auf als bei den Messungen der Vorversuche (E 36: 0,88; B 35: 0,83).

Stomatäre Leitfähigkeit

Neben der Photosynthese zeigte auch die stomatäre Leitfähigkeit (s cm^{-1}) eine starke Abhängigkeit vom Blattdruckpotential der Blätter (Abb. 3.17):

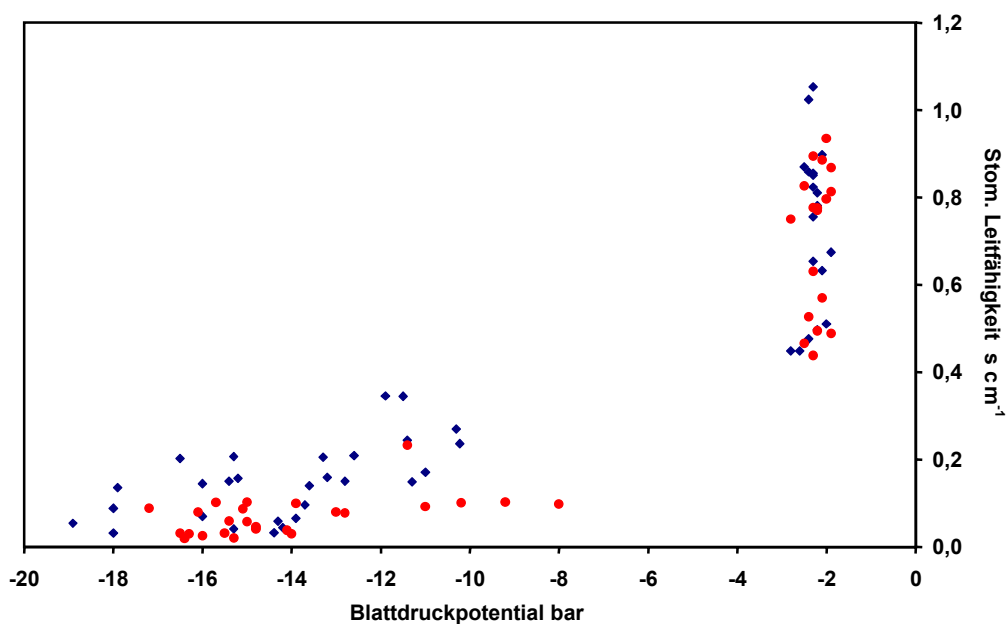


Abb. 3.17: Stomatäre Leitfähigkeit in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Die Kontrollpflanzen wiesen bei einem Blattdruckpotential um -2 bar stark unterschiedliche stomatäre Leitfähigkeitswerte zwischen 0,4 und 1 auf. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Kultivaren war nicht zu erkennen. Bei den gestreßten Pflanzen lag bei allen Blattdruckpotentialen die stomatäre Leitfähigkeit der Sorte E 36 etwa doppelt so hoch wie die der Sorte B 35.

Trägt man die Photosyntheserate gegen die stomatäre Leitfähigkeit auf, so ergibt sich folgendes Bild (Abb. 3.18).

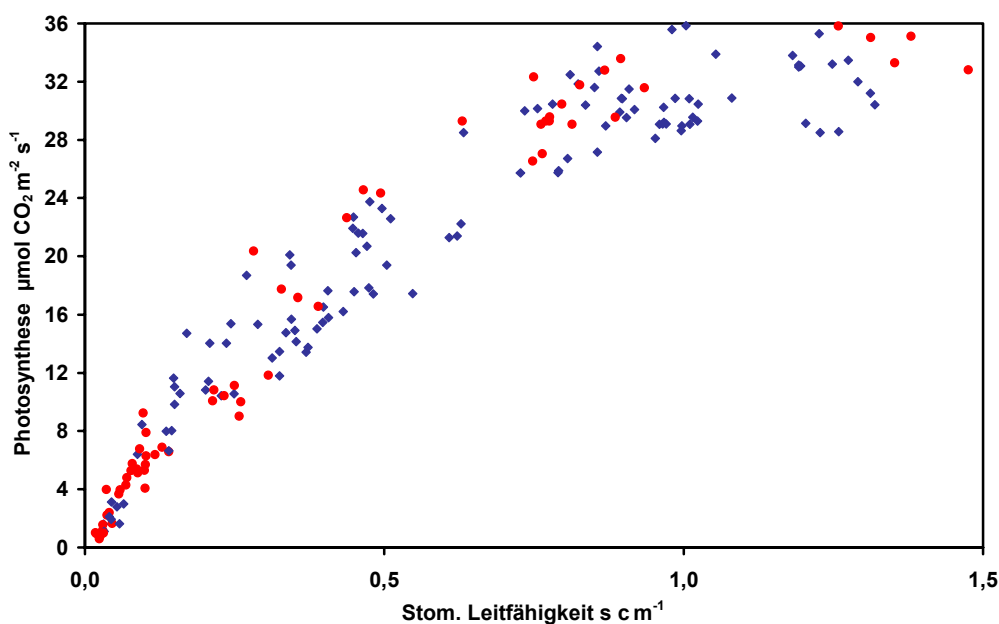


Abb. 3.18: Photosyntheserate in Abhängigkeit der stomatären Leitfähigkeit. Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Photosynthese und stomatäre Leitfähigkeit zeigten eine starke Korrelation, es ergab sich eine Kurve, die in ihrer Form einer klassischen Sättigungskurve entspricht. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kultivaren war nicht erkennbar.

Interzellulärer CO₂-Gehalt

Aufgrund der starken Korrelation zwischen Photosynthese und stomatärem Widerstand lag die Vermutung nahe, daß die verschiedenen Photosyntheseraten der beiden Kultivare unter Streßbedingungen auf unterschiedliche interzelluläre CO₂-Konzentrationen zurückzuführen sind, welche durch Unterschiede der stomatären Leitfähigkeit unter Streß (sich. Abb. 3.17) verursacht werden. Trägt man die interzellulären CO₂-Konzentrationen gegen den Blattdruck auf (Abb. 3.19), ergibt sich ein überraschendes Bild:

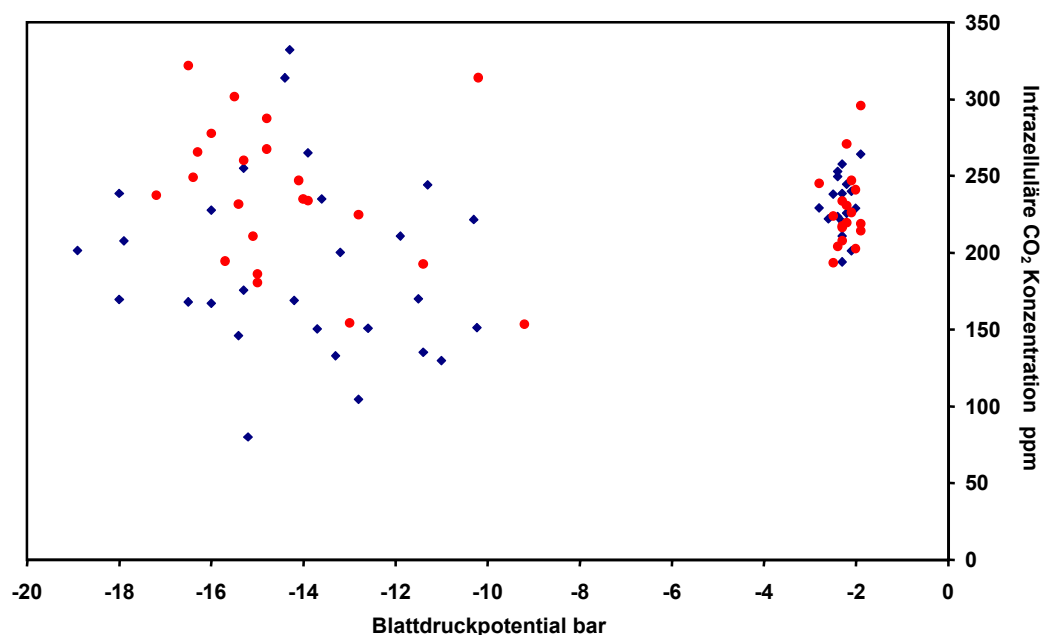


Abb. 3.19: Interzelluläre CO₂ Konzentration in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials.
Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

In den Kontrollpflanzen schwankte die interzelluläre CO₂-Konzentration zwischen 200 und 300 ppm, ein Unterschied zwischen beiden Kultivaren war nicht zu erkennen. Die trockengestreßten Pflanzen variierten in den CO₂-Konzentrationen wesentlich stärker als die Kontrollpflanzen. Ein Sinken der CO₂-Konzentration unter Streß war jedoch nicht zu erkennen, im Mittel lagen die Werte der B 35 Pflanzen leicht über denen von E 36.

Niedrige interzelluläre CO₂-Gehalte, wie sie in C₃-Pflanzen zu einem Sinken der Photosynthese führen, konnten bei den untersuchten *Sorghum*-Kultivaren nicht beobachtet werden.

3.3.2 Gaswechsellmessungen unter vermindertem CO₂-Gehalt

Die Darstellung der Meßergebnisse unter vermindertem CO₂-Gehalt erfolgt an dieser Stelle aufgrund der methodischen Übereinstimmung mit den in Kapitel 3.3.1 vorgelegten Ergebnissen. Chronologisch erfolgten sie erst zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt dieser Promotionsarbeit.

Für die Gaswechsellmessungen unter vermindertem CO₂-Gehalt der Atmosphäre wurde der gleiche Meßaufbau verwendet wie für die normalen Gaswechsellmessungen. Die Pflanzen verblieben dabei so lange in der Meßküvette, bis nahezu der gesamte CO₂-Gehalt des Meßgases aufgebraucht war. Bei besonders kleinen Blättern oder sehr niedriger Photosyntheserate konnte zusätzlich CO₂ chemisch entfernt werden, in dem ein Teil des Gasstroms über Natronkalk geleitet wurde, der CO₂ bindet.

Photosynthese

Diagramm 3.20 zeigt die Photosyntheserate in Abhängigkeit von der CO_2 -Konzentration des Meßgases und des Blattdruckpotentials.

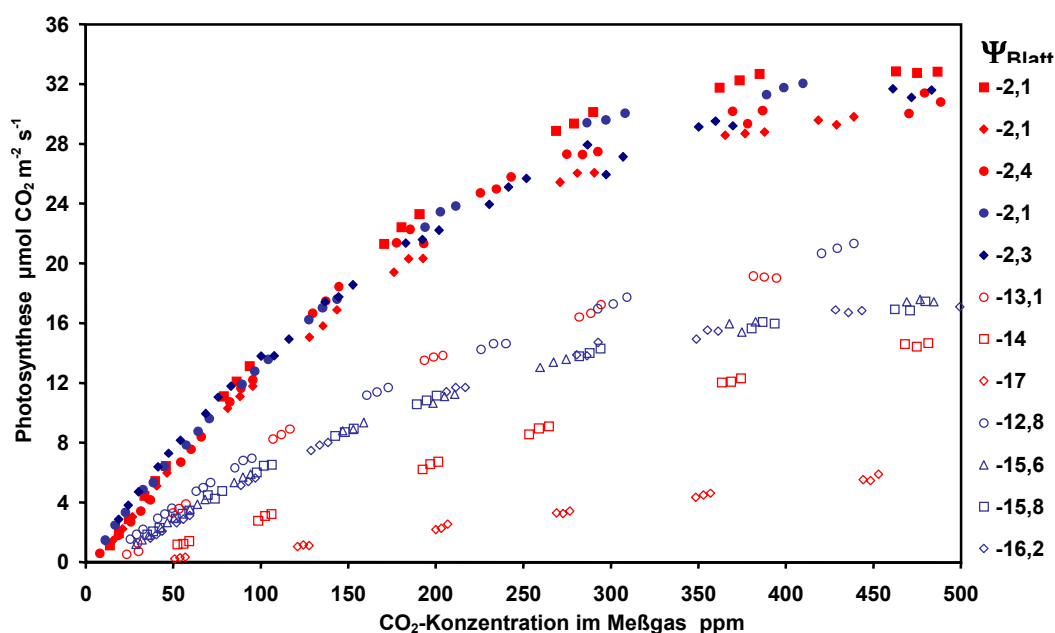


Abb. 3.20: Photosyntheserate in Abhängigkeit vom CO_2 -Gehalt des Meßgases und des Blattdruckpotentials.
Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Wie zu erwarten, ergibt sich bei der Darstellung der Photosynthese in Abhängigkeit der CO_2 -Konzentration eine Sättigungskurve. Die Meßpunkte der Kontrollpflanzen mit Blattdruckpotentialen zwischen -2,1 und -2,4 bar lagen fast deckungsgleich aufeinander. Die gestreßten Pflanzen zeigten deutlich flachere Kurvenverläufe, abhängig von der Sorte und der Streßintensität, dargestellt als Blattdruckpotential. Innerhalb der gleichen Sorte wird der Kurvenverlauf bei sinkendem Blattdruckpotential flacher. Die ähnlich stark gestreßten E 36 Proben (-15,6; -15,8; -16,2 bar) hatten einen nahezu identischen Kurvenverlauf, die schwächer gestreßte Probe (-12,8 bar) besaß einen etwas steileren Anstieg der Kurve. Wie bei der Sorte E 36 war die Steilheit der Kurve auch bei B 35 abhängig vom Blattdruckpotential. Auffällig ist, daß die verhältnismäßig schwächer gestreßte B 35 (-14 bar) eine flachere Kurve aufwies, als die stärker gestreßten Pflanzen der Sorte E 36. Die mit -17 bar Blattdruckpotential am stärksten gestreßte B 35 Pflanze zeigte den flachsten Kurvenanstieg aller Versuchspflanzen.

Stomatäre Leitfähigkeit

Wie bei den vorhergegangenen Gaswechsellmessungen unter konstantem CO₂-Gehalt der Atmosphäre (Abb. 3.16) war die stomatäre Leitfähigkeit der Kontrollpflanzen wesentlich höher, als in den gestreßten Pflanzen (Abb. 3.21).

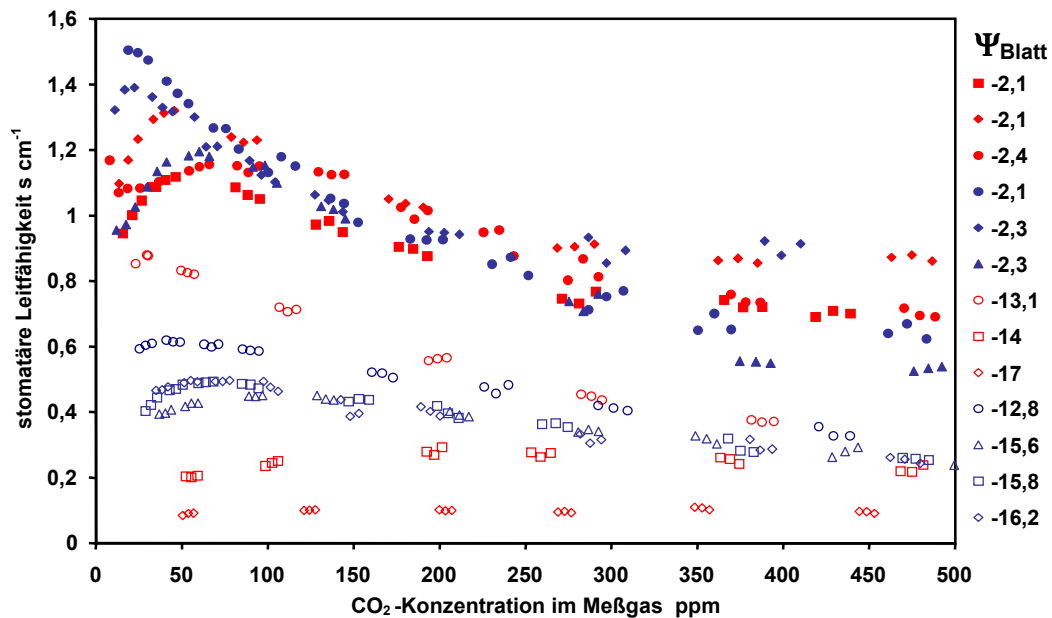


Abb. 3.21: Stomatäre Leitfähigkeit in Abhängigkeit vom CO₂-Gehalt des Meßgases und des Blattdruckpotentials. Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Bei sinkendem CO₂-Gehalt des Meßgases (< 350 ppm) stieg die stomatäre Leitfähigkeit an und erreichte bei den Kontrollpflanzen unter extremem CO₂-Mangel fast den doppelten Wert wie unter Normalbedingungen.

Im Gegensatz dazu waren die gestreßten Pflanzen nur bedingt in der Lage, auf den sinkenden CO₂-Gehalt durch Öffnen der Stomata zu reagieren. Je stärker die Trockenstreßbelastung für die Versuchspflanzen war, desto geringer wirkte CO₂ als Effektor auf die stomatäre Leitfähigkeit.

Interzellulärer CO₂-Gehalt

Trotz der sehr unterschiedlichen stomatären Leitfähigkeit blieb das Verhältnis der interzellulären CO₂-Konzentration zum CO₂-Gehalt des Meßgases in allen Pflanzen konstant (Abb. 3.22):

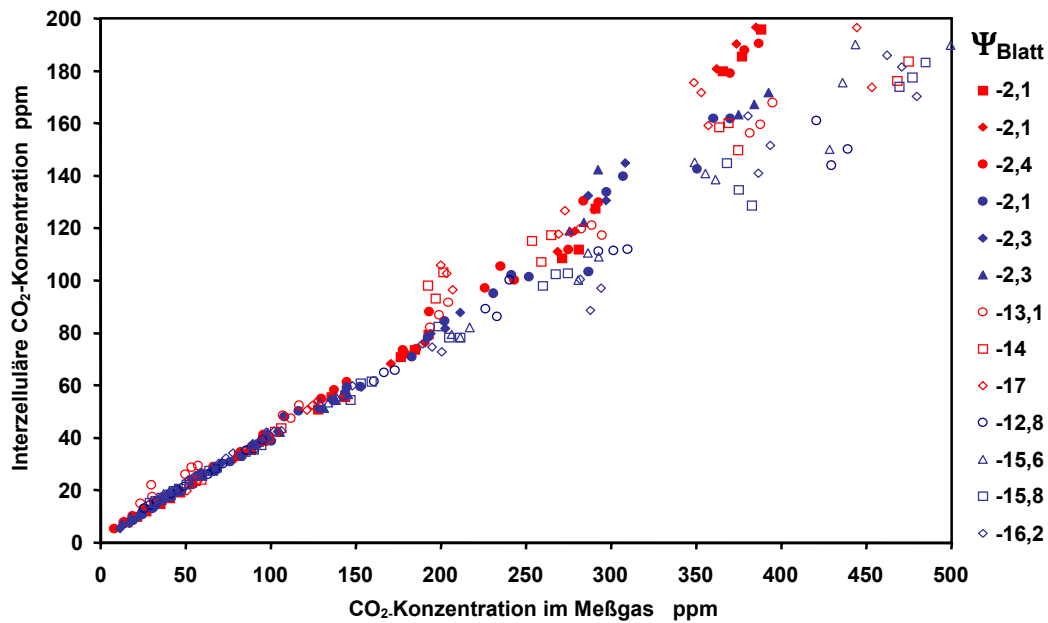


Abb. 3.22: Interzellulärer CO₂-Gehalt in Abhängigkeit von der äußeren CO₂-Konzentration und des Blattdruckpotentials. Rote Symbole B 35, blaue Symbole E 36.

Die Photosyntheserate scheint also nicht durch die stomatäre Leitfähigkeit und den CO₂-Gehalt im Blatt bestimmt zu werden, sondern der CO₂-Verbrauch wirkte rückkoppelnd auf die Öffnungsweite der Stomata.

Trägt man die Photosyntheserate in Abhängigkeit von der interzellulären CO_2 -Konzentration auf, ergibt sich folgendes Bild:

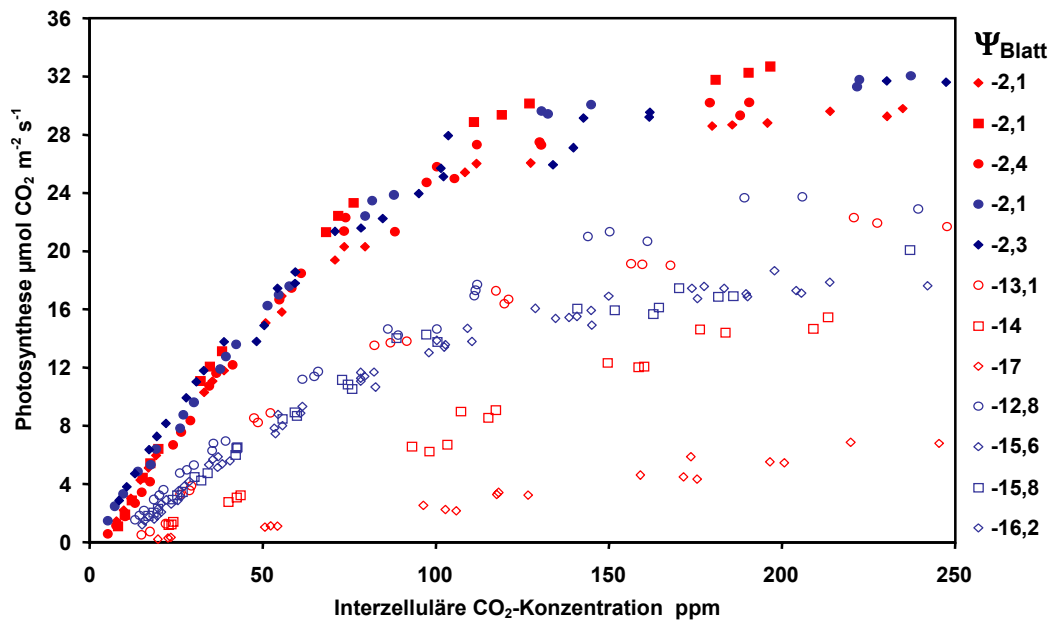


Abb. 3.23: Photosyntheserate in Abhängigkeit von der interzellulären CO_2 -Konzentration und des Blattdruckpotentials. Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Der Kurvenverlauf gleicht dem in Abb. 3.20 gezeigten, was aufgrund der strengen Korrelation zwischen dem CO_2 -Gehalt des Meßgases und des interzellulären CO_2 -Gehaltes (siehe Abb. 3.22) zu erwarten war. Die Kinetik der CO_2 -Aufnahme unter den gewählten Versuchsbedingungen war von der Aktivität des primären CO_2 -Akzeptors, der Phospho-*enol*-pyruvat Carboxylase (PEPCase), abhängig und deutet an, daß die Photosynthese in den trockengestreßten Pflanzen nicht durch stomatäre Effekte und die Verfügbarkeit von CO_2 reguliert wurde, sondern durch eine verringerte PEPCase-Aktivität limitiert wurde.

3.3.3 Chlorophyllfluoreszenz-Messungen

Die Chlorophyllfluoreszenz-Messungen wurden unter zwei verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Zum einen erfolgten die Messungen an Blattscheiben in einer abgeschlossenen Meßküvette unter erhöhtem CO₂-Gehalt (5%), um mögliche stomatäre Effekte und den daraus resultierenden CO₂-Mangel auszuschließen. Weitere Messungen wurden in der Klimakammer an intakten Pflanzen unter Anzuchtbedingungen durchgeführt. Die dabei ermittelten Daten lassen sich direkt mit den Ergebnissen der Gaswechsellmessungen vergleichen, die an den gleichen Pflanzen durchgeführt wurden.

3.3.3.1 Messungen an Blattscheiben unter erhöhtem CO₂-Gehalt

Der erste untersuchte Fluoreszenzparameter ist das F_v/F_m -Verhältnis, welches bereits in den Vorversuchen an allen Blättern unter Anzuchtbedingungen untersucht wurde. Die Werte der Kontrollpflanzen lagen im Mittel bei 0,78 und zeigten eine große Homogenität (Abb. 3.24).

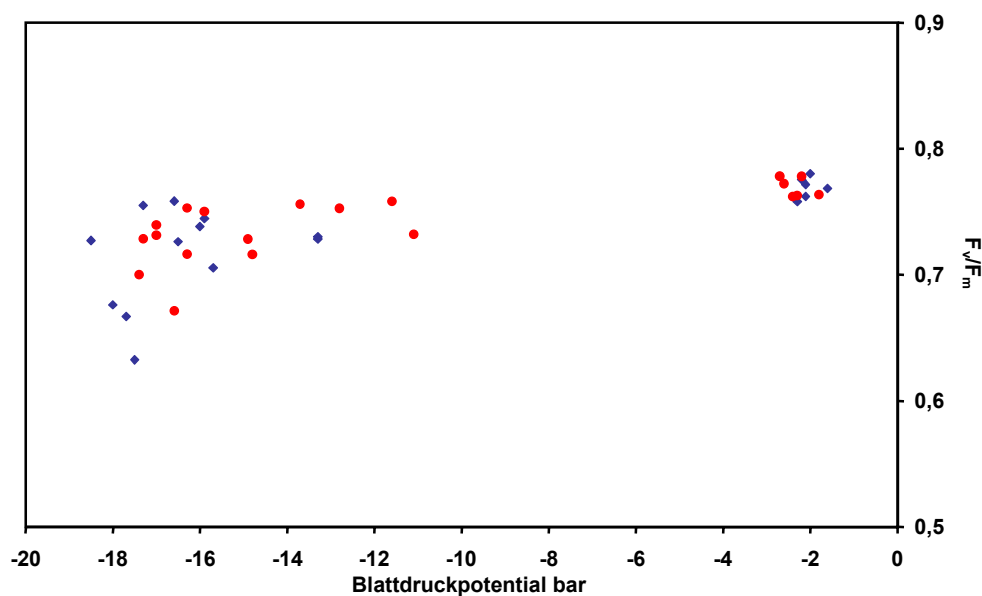


Abb. 3.24: F_v/F_m in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Das F_v/F_m -Verhältnis der gestreßten Pflanzen sank unter diesen Versuchsbedingungen weniger stark als in den Vorversuchen und lag im Mittel bei ca. 0,72, was auf eine nur schwache Beeinträchtigung des Photosyntheseapparats durch den Trockenstreß hinweist. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Sorten ist nicht zu erkennen.

Ein gänzlich anderes Bild zeigte der nächste untersuchte Parameter der photochemischen Fluoreszenzlöschung (q_p), wobei man ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Kultivaren erkennt (Abb. 3.25).

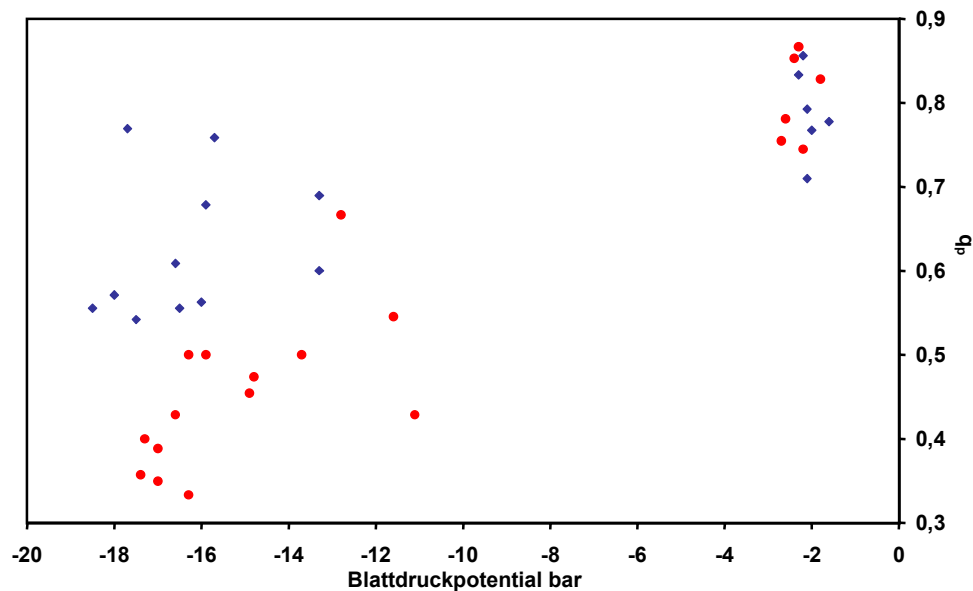


Abb. 3.25: q_p in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Bei den Kontrollpflanzen ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kultivaren zu erkennen, die Werte für die photochemische Fluoreszenzlöschung lagen zwischen 0,7 und 0,88. Dies bedeutet, daß die Pflanzen einen großen Anteil der Lichtenergie in chemische Energie umwandeln konnten. Unter Streßbedingungen zeigten beide Sorten jedoch ein signifikant unterschiedliches Verhalten. Während die photochemische Löschung bei der Sorte E 36 unter Streß nur geringfügig um etwa ein Viertel sank, lagen die Werte der gestreßten B 35 Pflanzen ungefähr um die Hälfte niedriger als bei den Kontrollpflanzen.

Aufgrund der starken Korrelation (E 36: $r=0,93$; B 35: $r=0,97$) zwischen dem photochemischen Löschungskoeffizienten q_p und dem Genty-Koeffizienten ($\phi_{ps\ II}$), lag auch die Quantenausbeute der gestreßten E 36 Pflanzen deutlich über der der Sorte B 35 (Abb. 3.26).

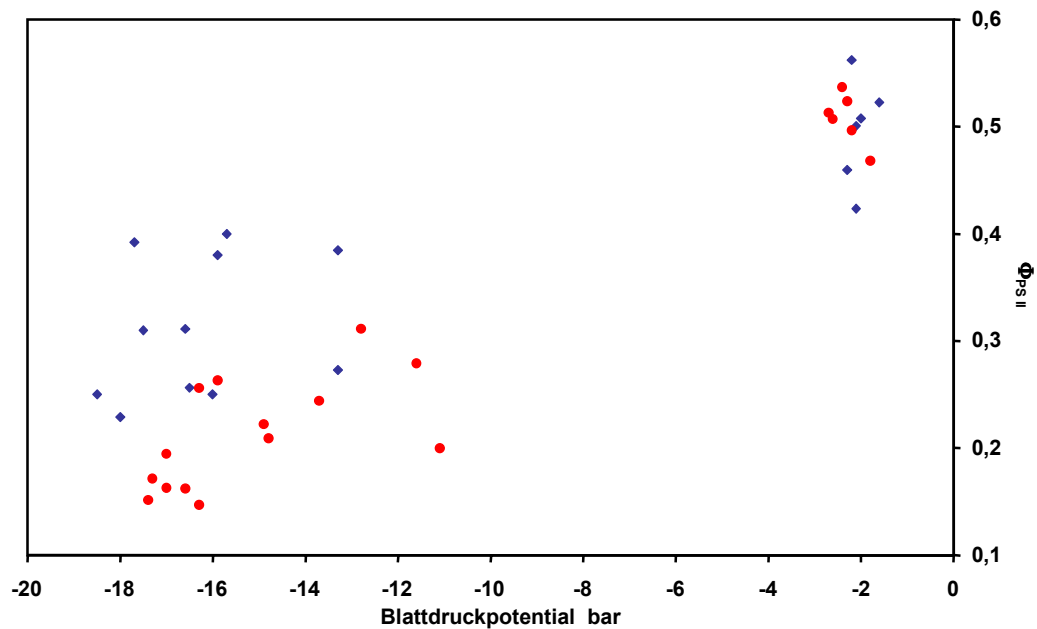


Abb. 3.26: Quantenausbeute in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Wie zu erwarten war, kam es bei sinkendem q_p zu einer Erhöhung des nicht-photochemischen Löschungskoeffizienten q_n (Abb. 3.27):

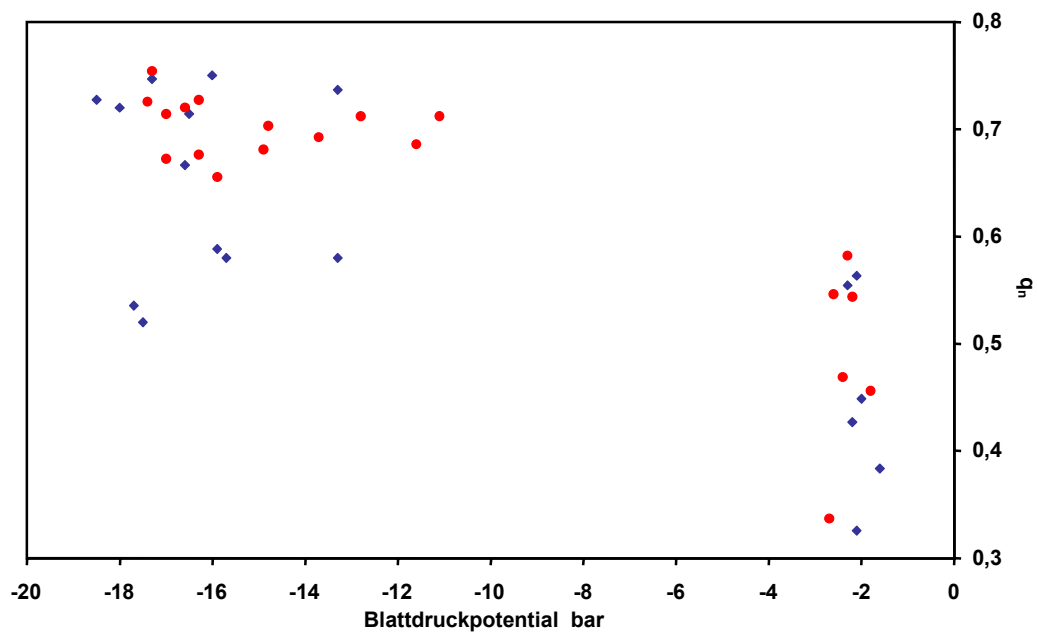


Abb. 3.27: q_n in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Auffällig waren die großen Streuungen der q_n -Werte von 0,3 - 0,6 bei den Kontrollpflanzen beider Sorten. Bei den gestreßten Pflanzen zeigte die Sorte E 36 ebenfalls stark streuende Werte zwischen 0,5 und 0,75. Damit wiesen die gestreßten Pflanzen z.T. eine geringere nicht-photochemische Löschung auf als einige Kontrollpflanzen. Die gestreßten Pflanzen der Sorte B 35 zeigten mit q_n -Werten von 0,65 - 0,75 eine höhere Homogenität. Es scheint, als läge die nicht-photochemische Löschung bei E 36 etwas niedriger als bei B 35, was jedoch nur einen Trend andeutet und statistisch nicht abgesichert ist. Analysiert man, welche Faktoren bestimmend für die nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung (q_n) waren und trennt diese in schnell- und langsam relaxierenden Komponenten q_f (Abb. 3.28) und q_i (Abb. 3.29) auf, fällt die große Ähnlichkeit der Diagramme von q_n und q_f auf.

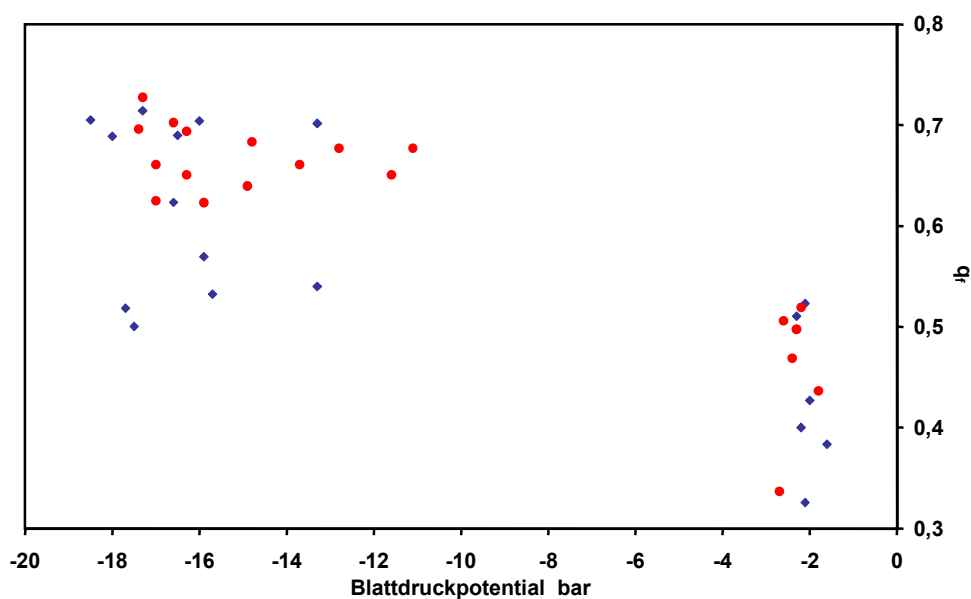


Abb. 3.28: q_f in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Unterzieht man die Wertepaare einer Korrelationsanalyse, ergibt sich mit einem Korrelationskoeffizienten r_{xy} von 0,99 (E36), bzw. 0,97 (B 35) eine extrem starke Beziehung zwischen q_n und q_f .

Im Gegensatz dazu ist der Anteil des photoinhibitorischen Löschungskoeffizienten q_i auf q_n sehr gering (Abb. 3.29):

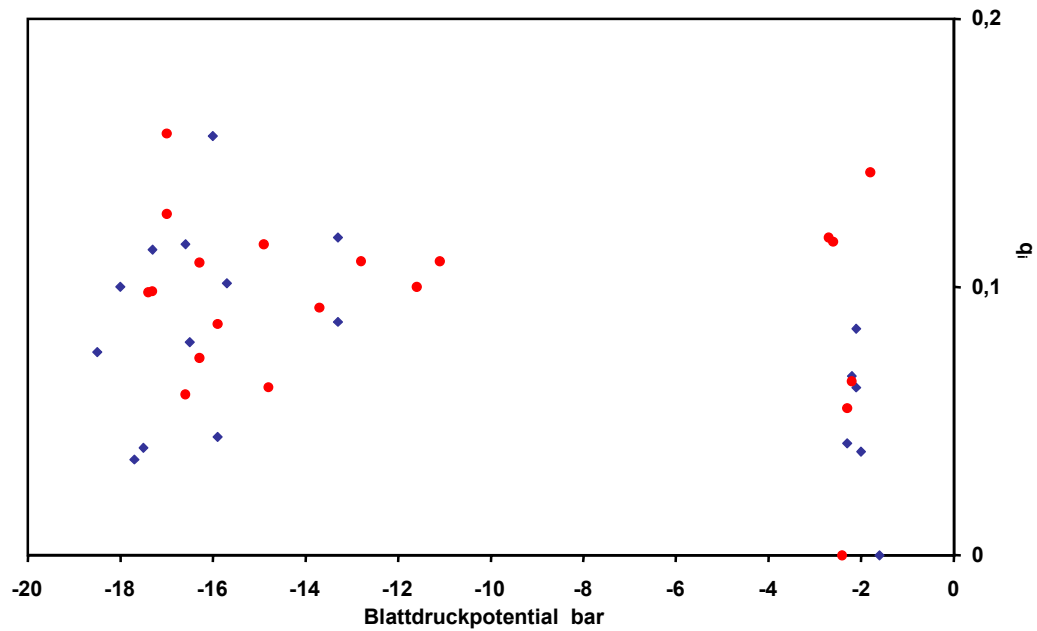


Abb. 3.29: q_i in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Die gestreßten Pflanzen beider Sorten zeigten mit Werten für q_i zwischen 0,02 und 0,15 keine signifikant höhere Photoinhibition als die Kontrollpflanzen (0 - 0,13). Dies deutet darauf hin, daß die höhere nicht-photochemische Löschung der gestreßten Pflanzen nicht durch eine Zunahme der Photoinhibition verursacht wurde..

3.3.3.2 Messungen an intakten Blättern unter Anzuchtbedingungen

Die in der Klimakammer unter Anzuchtbedingungen durchgeführten Messungen zeigten tendenziell nur geringe Unterschiede zu den an Blattscheiben vorgenommenen Untersuchungen unter erhöhtem CO₂-Gehalt. Das F_v/F_m -Verhältnis sank bei den gestreßten Pflanzen etwas stärker ab als bei den Messungen mit erhöhtem CO₂-Gehalt des Meßgases (Abb.3.30):

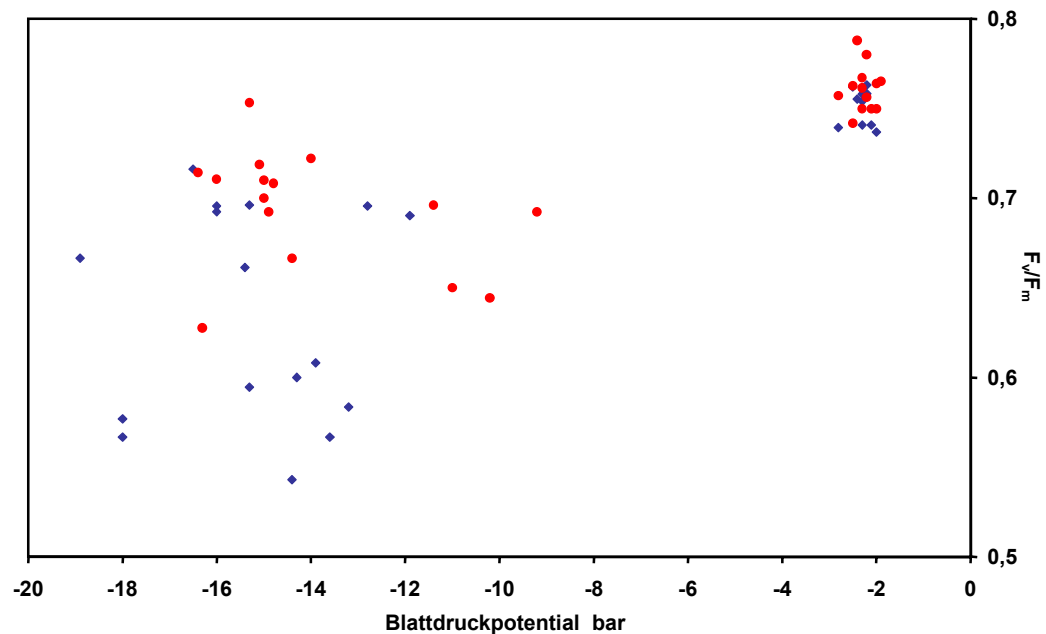


Abb. 3.30: F_v/F_m -Verhältnis in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Unter diesen Versuchsbedingungen ließ sich darüber hinaus auch ein Unterschied zwischen der Sorte B 35, deren F_v/F_m -Verhältnis nur geringfügig sank, und der Sorte E 36, die ein signifikant niedrigeres F_v/F_m -Verhältnis zeigte, erkennen. Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede zwischen dieser Messung und der unter erhöhtem CO₂-Gehalt könnte neben der unterschiedlichen CO₂-Versorgung auch die Zeitdauer bis zum Meßbeginn in der Küvette sein, in der die gestreßten Pflanzen im Schwachlicht evtl. teilweise regenerieren konnten.

Die Meßwerte des photochemischen Lösungskoeffizienten q_p zeigten keine großen Unterschiede zu den in der Blattküvette ermittelten Daten. (Abb. 3.31).

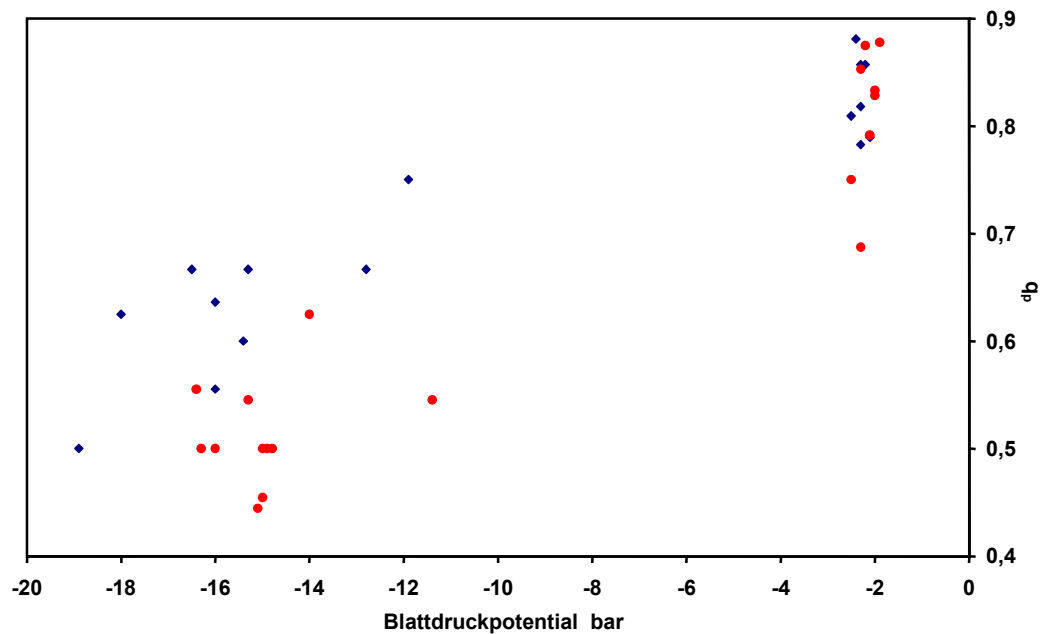


Abb. 3.31: q_p in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Wie schon in der vorausgegangenen Versuchreihe korrelierte das höhere q_p der gestreßten E 36 Pflanzen mit einer höheren Quantenausbeute $\phi_{PS II}$ (Abb.3.32).

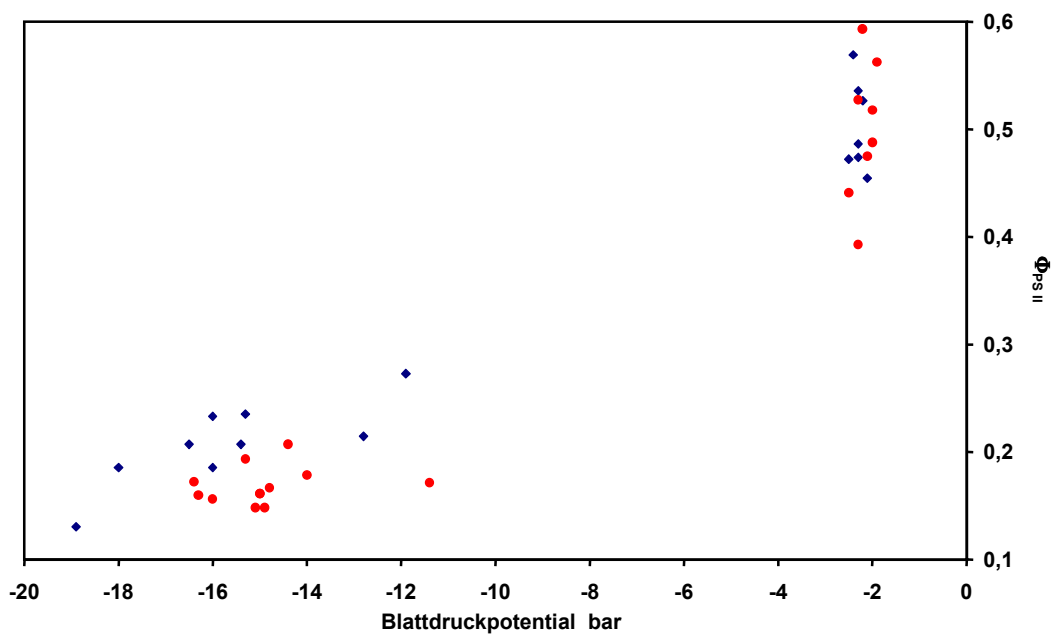


Abb. 3.32: Quantenausbeute in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials . Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Im Vergleich zu den Versuchen unter höherem CO₂-Gehalt war die Quantenausbeute der gestreßten Pflanzen insgesamt wesentlich niedriger, wohingegen bei den Kontrollpflanzen kein signifikanter Unterschied festzustellen war.

Auch die nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung q_n zeigte ein ähnliches Verhalten wie unter erhöhtem CO₂-Gehalt (Abb.3.33).

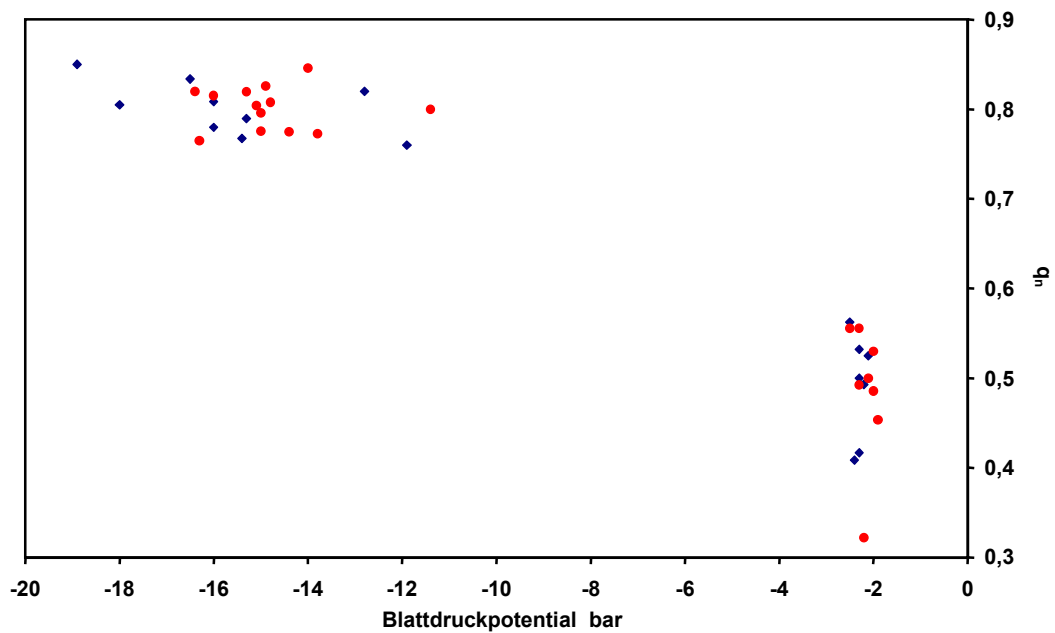


Abb. 3.33: q_n in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Wie bei den vorausgegangenen Messungen stieg q_n unter Streß in beiden Sorten an und erreichte unter den Anzuchtbedingungen etwas höhere Werte als unter erhöhter CO₂-Versorgung.

Anhand des Kurvenverlaufs und der hohen Korrelation läßt sich wiederum erkennen, daß der Faktor q_n stark durch q_f geprägt war (Abb. 3.34) (Tab.3.1).

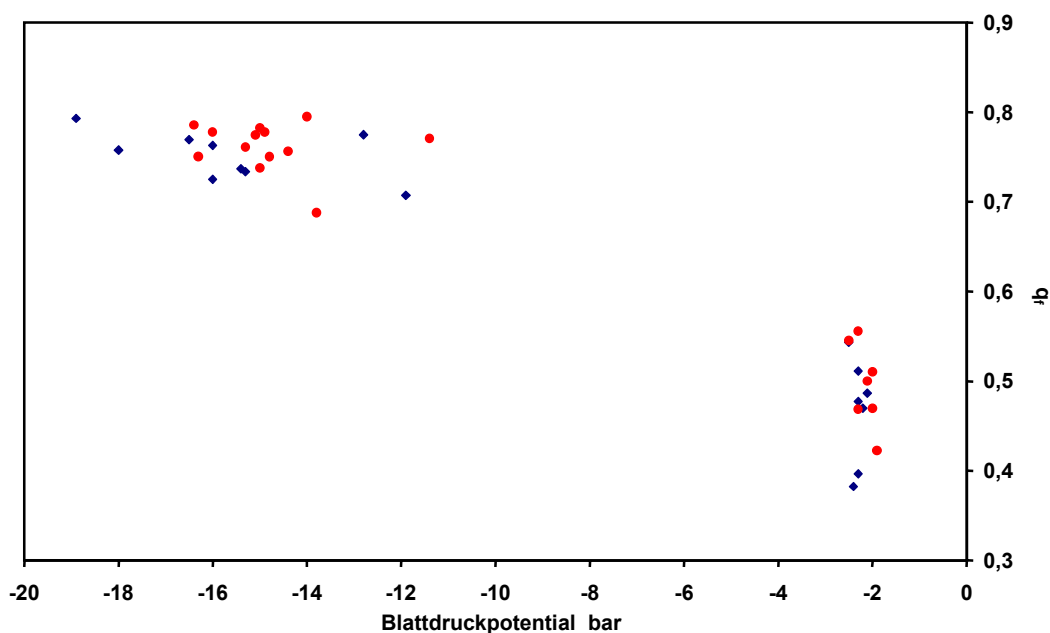


Abb. 3.34 q_f in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. Rote Symbole. B 35; blaue Symbole. E 36.

Auch die q_f -Werte der gestreßten Pflanzen lagen bei den Messungen in der Klimakammer etwas höher als bei den Messungen in der Blattküvette mit erhöhtem CO_2 -Gehalt.

Das gilt auch für den photoinhibitorischen Löschungskoeffizienten q_i , der bei den Messungen unter Anzuchtbedingungen in den gestreßten Pflanzen beider Sorten stärker stieg als in den vorausgegangenen Messungen (Abb. 3.35):

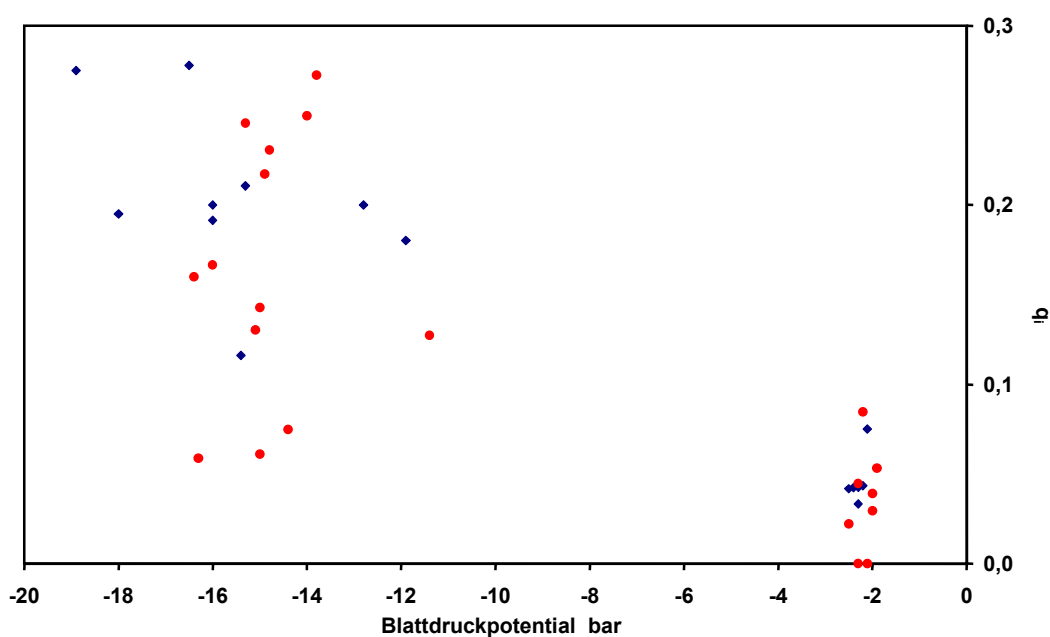


Abb. 3.35: q_i in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. Rote Symbole B 35, blaue Symbole E 36.

Insgesamt deuten die Fluoreszenzmessungen an den Pflanzen unter Anzuchtbedingungen auf etwas stärkeren Streß hin als bei den Messungen unter erhöhtem CO₂-Gehalt. Der Unterschied in q_p der gestreßten Pflanzen und Kontrollpflanzen war geringer, wie auch die Quantenausbeute, wohingegen ein Anstieg der Photoinhibition festzustellen war. Dies könnte darauf hinweisen, daß unter "natürlichen" Bedingungen die Effekte, die bei erhöhtem CO₂-Gehalt festgestellt wurden, durch stomatäre Effekte überlagert wurden. Trotzdem ließen sich auch unter diesen Bedingungen Unterschiede zwischen beiden Sorten feststellen. Dabei fiel am stärksten die photochemische Fluoreszenzlöschung auf, die, wie auch die Gaswechsellmessungen unter vermindertem CO₂-Gehalt, auf Unterschiede der Enzymaktivität unter Trockenstreß hindeutete.

Da die Fluoreszenzmessungen an den gleichen Pflanzen durchgeführt wurden wie die Gaswechsellmessungen, ließen sich einzelnen Meßparameter zueinander in einer Korrelationsanalyse in Beziehung setzen (Tab. 3.2). Dabei zeigten sich mit einer Ausnahme durchgängig hohe Korrelationen ($r_{x,y} > 0,6$) zwischen den einzelnen Parametern.

		PS	Blatt- druck	F_v/F_m	q_p	q_n	q_f	q_i
$\Phi_{PS II}$	E 36	0,98	0,98	0,79	0,95	-0,99	-0,99	-0,92
	B 35	0,96	0,96	0,74	0,96	-0,98	-0,98	-0,62
q_i	E 36	-0,90	-0,93	-0,65	-0,84	0,93	0,91	
	B 35	-0,72	-0,71	-0,16	-0,55	0,70	0,60	
q_f	E 36	-0,96	-0,95	-0,74	-0,91	1,00		
	B 35	-0,91	-0,92	-0,68	-0,91	0,99		
q_n	E 36	-0,96	-0,96	-0,73	-0,91			
	B 35	-0,93	-0,95	-0,64	-0,90			
q_p	E 36	0,95	0,92	0,74				
	B 35	0,92	0,90	0,68				
F_v/F_m	E 36	0,84	0,81					
	B 35	0,71	0,71					
Blatt- druck	E 36	0,98						
	B 35	0,98						

Tab. 3.2: Korrelationsanalyse der Photosynthese und Fluoreszenzparametern.

Die besonders hohe Korrelation zwischen q_n und q_f deutete auf einen starken Einfluß des Xanthophyllzyklus auf die nicht-photochemische Löschung hin, weshalb im weiteren Verlauf dieser Promotionsarbeit auch die Kinetik der Deepoxidation dieser Pigmente in weiteren Experimenten untersucht wurde (sich. Kap. 3.3.5).

3.3.4 Enzym-Aktivitäten

Um herauszufinden, ob die sinkende Photosyntheseleistung unter Trockenstreß durch verringerte Aktivität von Enzymen des C_4 - und Calvin-Zyklus verursacht wird, wurde ihre Aktivität gemessen und der Substratumsatz auf die Blattfläche bezogen. Diese Form der Auswertung erlaubt einen direkten Vergleich zwischen der Enzymaktivität und der ebenfalls blattflächenbezogenen Photosyntheserate. Nach dem "Flaschenhals"-Prinzip bestimmt die langsamste Teilreaktion die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion. Im Falle einer Limitierung der Photosyntheserate durch ein bestimmtes Enzym sollten die gemessenen Enzymaktivitäten also den Photosyntheseraten entsprechen. Aus diesem Grund sind im Folgenden die Enzymaktivitäten gegen die Photosyntheserate aufgetragen. Zur Verdeutlichung, bei welcher Enzymaktivität die Photosynthese limitiert würde, sind in die Diagramme Geraden eingezeichnet, die einer 1:1 Relation von Enzymaktivität und Photosynthese entsprechen. Im Falle einer Limitierung durch ein Enzym sind die Meßpunkte entlang dieser Gerade zu erwarten, ist das Enzym nicht limitierend, liegen die Meßpunkte oberhalb dieser Gerade. Meßpunkte, die deutlich unterhalb dieser Gerade liegen, sind nicht logisch erklärbar und bedeuten in der Regel einen Fehler im Rahmen der Messung.

3.3.4.1 Pyruvat-orthophosphat-dikinase (PPDK)

Die PPDK katalysiert in den Chloroplasten des Mesophylls die Bildung von Phospho-*enol*-pyruvat aus Pyruvat und ATP. In Arbeiten über Zuckerrohr (*Saccharum officinale*), einer weiteren C_4 -Spezies, wurde die PPDK als limitierendes Enzym unter Trockenstreß beschrieben (DU et al., 1996). Im Vergleich der PPDK-Aktivität der beiden *Sorghum*-Kultivare mit der Photosynthese (Abb. 3.36),

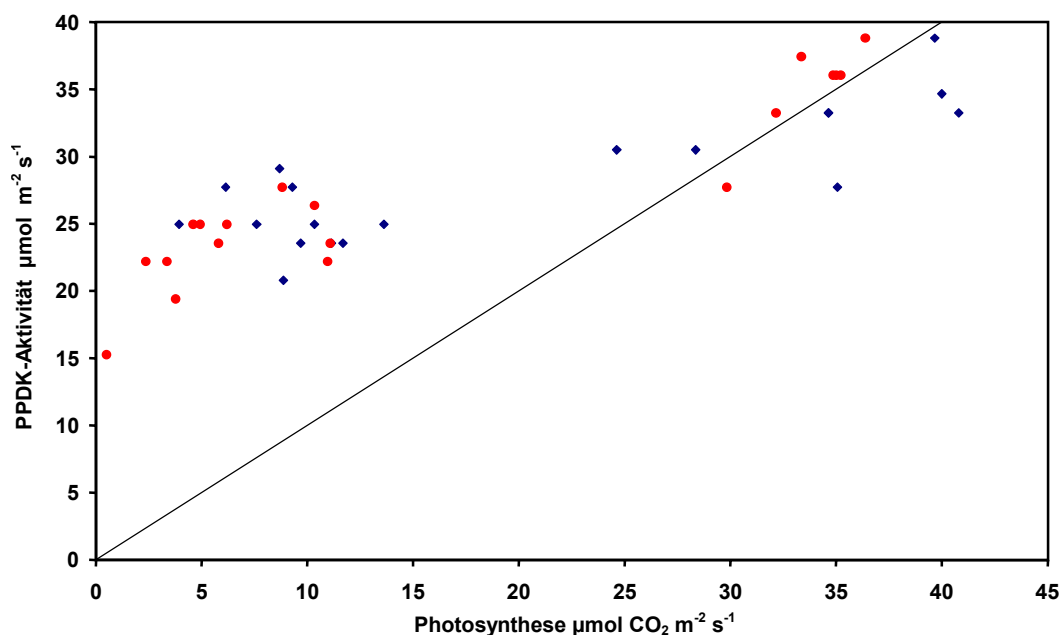


Abb. 3.36: PPDK-Aktivität in Abhängigkeit von der Photosyntheserate. Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

ließen sich bei den Kontrollpflanzen Enzymaktivitäten messen, die etwa im Bereich der Photosyntheserate lagen. Die Meßpunkte befanden sich nahe der Geraden, die der 1:1 Relation zwischen Enzymaktivität und Photosyntheserate entspricht.

Im Gegensatz dazu waren PPDK-Aktivitäten der gestreßten Pflanzen ca. zwei- bis fünffach größer als die gemessenen Photosyntheseraten. Ein Unterschied zwischen den beiden Sorten, der die unterschiedlichen Photosyntheseraten unter Streß erklären könnte, war nicht zu erkennen. Im Gegensatz zu den von DU et al. (1996) untersuchten Zuckerrohrpflanzen schien die Limitierung der Photosynthese unter Trockenstreß bei *Sorghum* also nicht durch die PPDK-Aktivität verursacht zu werden.

3.3.4.2 Phospho-enol-pyruvat Carboxylase (PEPCase)

C₄-Pflanzen fixieren CO₂ im Cytoplasma der Mesophyllzellen mit Hilfe der PEPCase, die aus HCO₃⁻ und Phospho-enol-pyruvat Oxalacetat bildet. Neben der Kohlenstofffixierung in C₄- und CAM-Pflanzen scheint die PEPCase auch eine wichtige Rolle in der pH-Regulation der Zelle zu spielen.

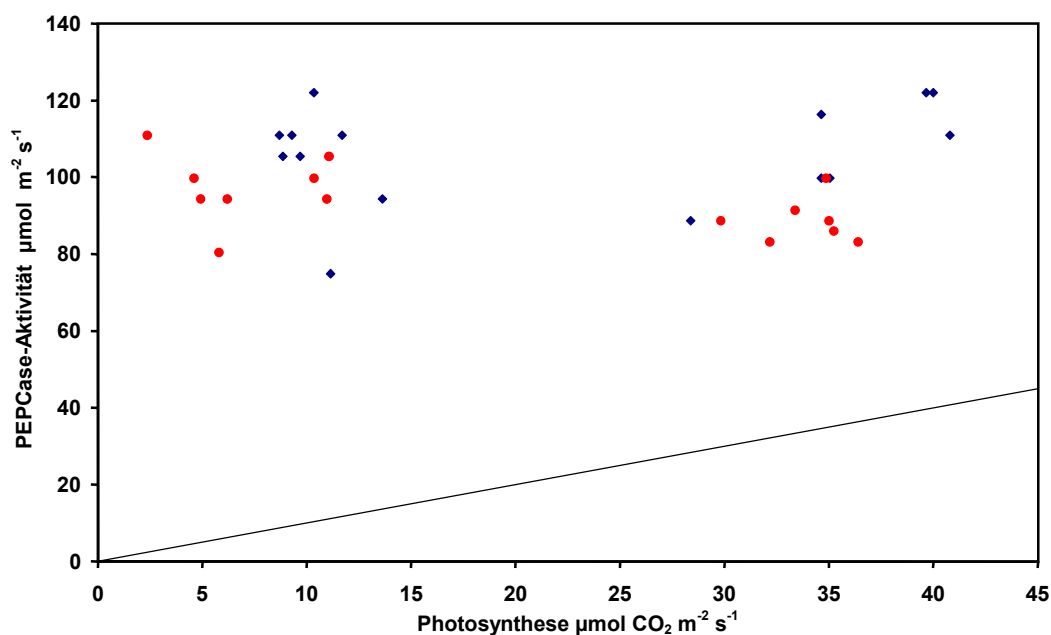


Abb. 3.37: PEPCase-Aktivität in Abhängigkeit von der Photosyntheserate. Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Im Vergleich mit der PPDK-Aktivität lagen die gemessenen PEPCase-Aktivitäten sowohl in den Kontrollpflanzen, als auch in den gestreßten Pflanzen deutlich über den Photosyntheseraten. In den gestreßten Pflanzen überstieg die mittlere PEPCase-Aktivität mit etwa 110 μmol m⁻² s⁻¹, die Photosynthese etwa um das zehnfache, bei den Kontrollpflanzen lag sie etwa noch um den Faktor drei über der Photosyntheserate. Im Gegensatz zur PPDK kam es bei der PEPCase nicht zu einem Rückgang der Aktivität unter Trockenstreß, die in vitro Umsatzraten beider Sorten blieben unverändert. Ein Unterschied zwischen beiden Sorten war, wie schon bei der PPDK, nicht zu ermitteln. Anhand dieser Daten schien die Photosynthese auf keinen Fall durch die maximale PEPCase-Aktivität limitiert zu werden.

Im Widerspruch dazu standen die Ergebnisse der Gaswechsellmessungen unter vermindertem CO₂-Gehalt des Meßgases (sieh. Kap. 3.3.2), die auf eine Inhibierung der PEPCase in vivo schließen ließen. Aus diesem Grund erfolgten weitere Untersuchungen zur Regulation der PEPCase-Aktivität. Dazu wurde zunächst das pH-Optimum ermittelt (Abb. 3.38).

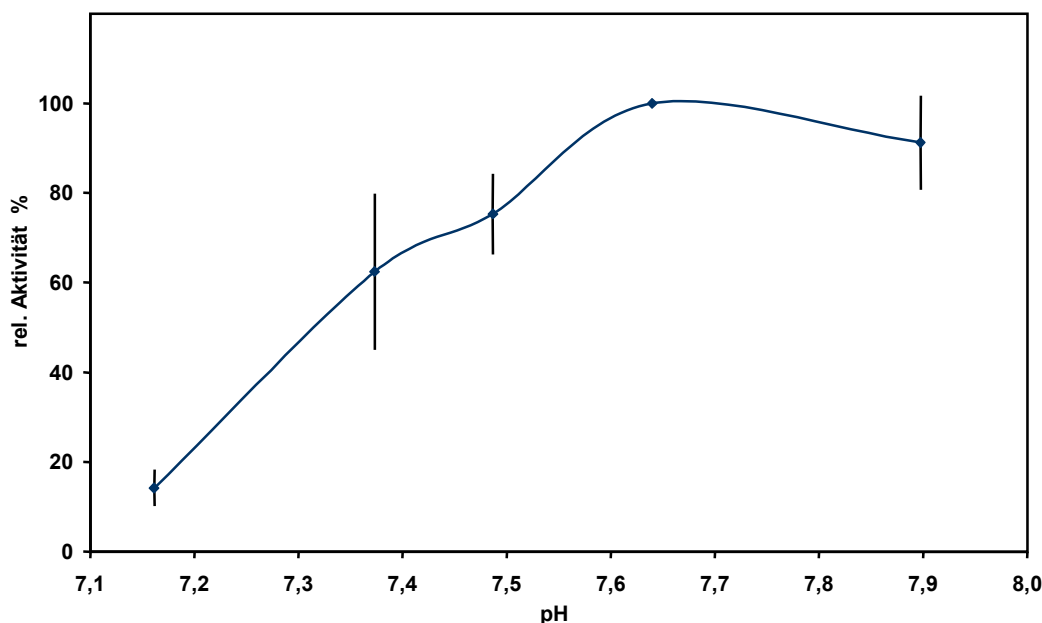


Abb. 3.38: PEPCase-Aktivität aus *Sorghum bicolor* cv. E 36 u. B 35 in Abhängigkeit des pH-Wertes.

Da die beiden verwendeten *Sorghum*-Kultivare keinen Unterschied hinsichtlich ihrer Eigenschaften der PEPCase aufwiesen, wurden die Meßwerte beider Kultivare gemittelt und nicht getrennt dargestellt.

Man erkennt eine deutliche pH-Abhängigkeit der PEPCase-Aktivität. Das pH-Optimum lag bei diesen Messungen etwa bei pH 7,7, zum neutralen Bereich hin war ein starker Aktivitätsverlust zu beobachten. Bei einem pH-Wert von 7,15 betrug die PEPCase-Aktivität nur noch etwa 15% der maximalen Aktivität bei pH 7,7. Betrachtet man den pH-Wert der Enzymtests (pH 7,8), so lag dieser nahe am gemessenen pH-Optimum wodurch die PEPCase-Aktivität etwa 95% ihrer Maximalaktivität betrug. Im Gegensatz dazu liegt der pH-Wert im Cytoplasma der Mesophyllzellen mit pH 7,3 (YIN et al., 1993) deutlich niedriger. Bei diesem pH-Wert beträgt die Aktivität der PEPCase nur noch etwa 50% ihrer maximalen Aktivität. Das bedeutet, daß die mittlere PEPCase-Aktivität von etwa 110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aufgrund des pH-Effektes in vivo vermutlich nur etwa 55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ beträgt.

Diese reduzierte Enzym-Aktivität liegt jedoch noch immer deutlich über den maximalen Photosyntheseraten und sollte aus diesem Grund weder in den gestreßten Pflanzen noch in den Kontrollpflanzen limitierend für die Photosyntheseaktivität sein. Damit die PEPCase-Aktivität limitierend wird, muß es also weitere inhibitorische Einflüsse geben. Starke Inhibitoren der PEPCase sind Malat und Oxalacetat (DEKLEVA und STROHL, 1988). Da der Einfluß von Oxalacetat nicht mit dem verwendeten Enzymkopplungstest nachzuweisen war, wurde lediglich der Einfluß von Malat auf die PEPCase-Aktivität untersucht. Dabei fiel auf, daß die Inhibition durch Malat stark abhängig vom pH-Wert war (Abb. 3.39).

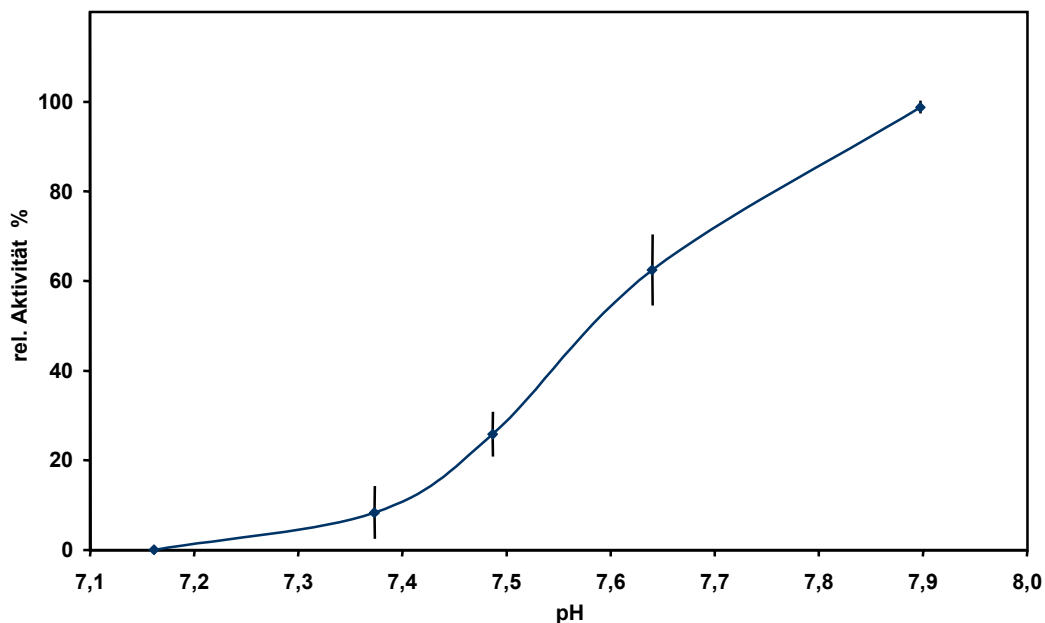


Abb. 3.39: PEPCase-Aktivität aus *Sorghum bicolor* cv. E 36 u. B 35 in Abhängigkeit des pH-Wertes in Anwesenheit von 10 mM Malat.

Bei einem pH-Wert von 7,15 wurde die PEPCase-Aktivität durch 10 mM Malat vollständig inhibiert. Dieser Effekt wurde mit steigendem pH-Wert des Reaktionsmediums immer geringer. Bei einem pH-Wert von 7,9 wurde die PEPCase-Aktivität durch Malat faktisch nicht mehr beeinflusst. Man erkennt, daß 10 mM Malat bei physiologischem pH-Wert von 7,3 die PEPCase-Aktivität bereits fast vollständig hemmte. Aus diesem Grund wurde die Inhibition der PEPCase bei physiologischem pH-Wert und verschiedenen Malatkonzentrationen untersucht (Abb. 3.40).

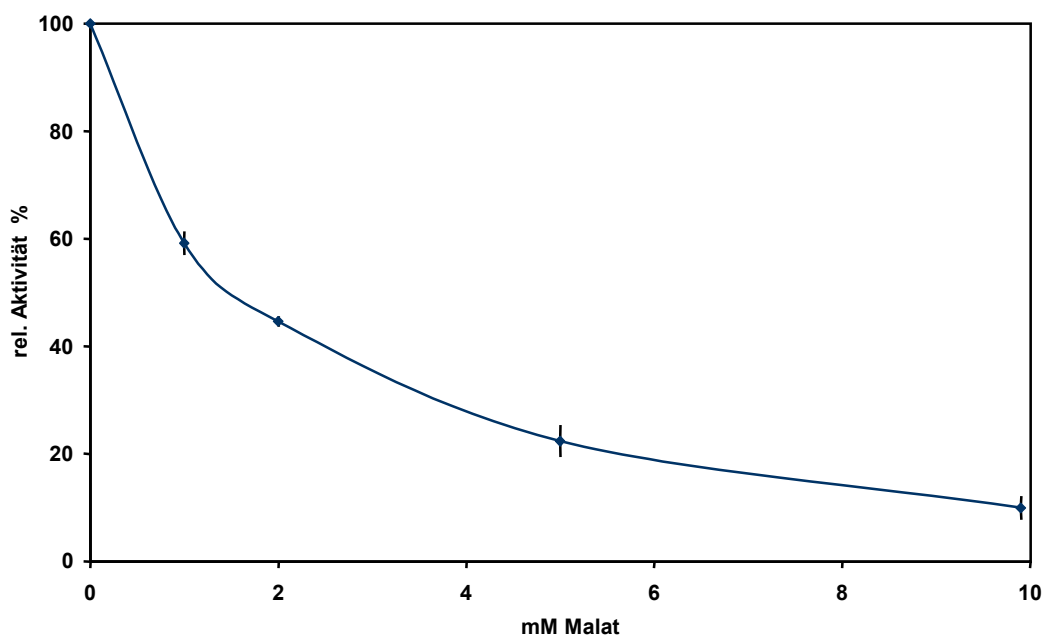


Abb. 3.40: PEPCase-Aktivität aus *Sorghum bicolor* cv. E 36 u. B 35 in Abhängigkeit der Malatkonzentration bei pH 7,3.

Bereits geringe Malatkonzentrationen hatten einen starken Effekt auf die Enzymaktivität, 2 mM Malat inhibierten die PEPCase-Aktivität um etwa 50%. Höhere Malatkonzentrationen verringerten die Enzymaktivität auf unter 15% der ursprünglichen Aktivität. Das bedeutet, daß die PEPCase bereits bei einer Malatkonzentration von 2 mM limitierend für die Photosynthese werden könnte, da die mittlere PEPCase-Aktivität von ca. $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei pH 7,3 um 50% auf etwa $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ reduziert würde, was ungefähr den Photosyntheseraten der Kontrollpflanzen entspricht.

3.3.4.3 NADPH-abhängige Malatdehydrogenase (MDH)

Wie bei der PEPCase ließen sich auch bei der Malatdehydrogenase sehr hohe Aktivitäten in den in vitro Assays messen. Bei den Kontrollpflanzen lagen die Werte zwischen 100 und $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und somit weit über der Photosyntheserate. Im Gegensatz zur PEPCase kam es unter Trockenstreß bei der MDH zu einem Verlust an Aktivität, der bei der Sorte B 35 signifikant stärker war als bei E 36 (Abb. 3.41).

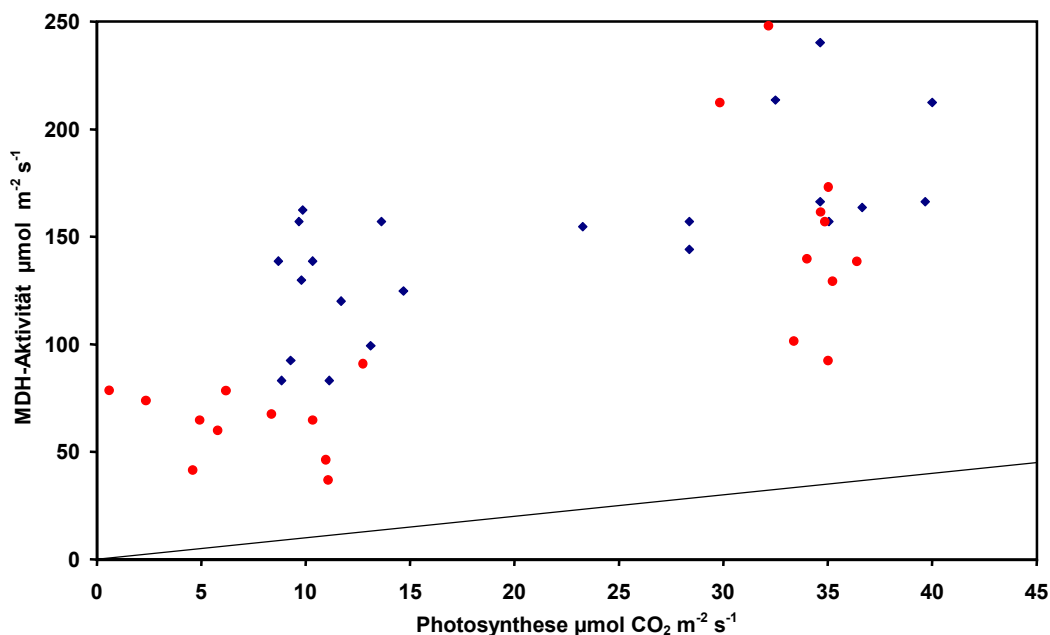


Abb. 3.41: MDH-Aktivität in Abhängigkeit von der Photosyntheserate. Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Obwohl die MDH-Aktivität der trockengestreßten B 35 Pflanzen nur etwa halb so hoch war wie die der gestreßten E 36 Pflanzen, lag sie immer noch drei- bis zehnfach über den gemessenen Photosyntheseraten und schien nicht limitierend für die Photosynthese zu sein. Auffällig ist jedoch der deutliche Unterschied der Enzymaktivität unter Streß zwischen beiden Sorten, der bei keinem anderen der untersuchten Enzyme zu erkennen war. Um zu testen, ob die hohen in vitro Enzymaktivitäten durch Reduktionsmittel im Testansatz möglicherweise stärker reduziert waren und somit eine höhere Aktivität aufwiesen als in vivo, wurde der Aktivierungsgrad der MDH in den Pflanzen beider Sorten unter Kontroll- und Streßbedingungen untersucht (Abb.3.42).

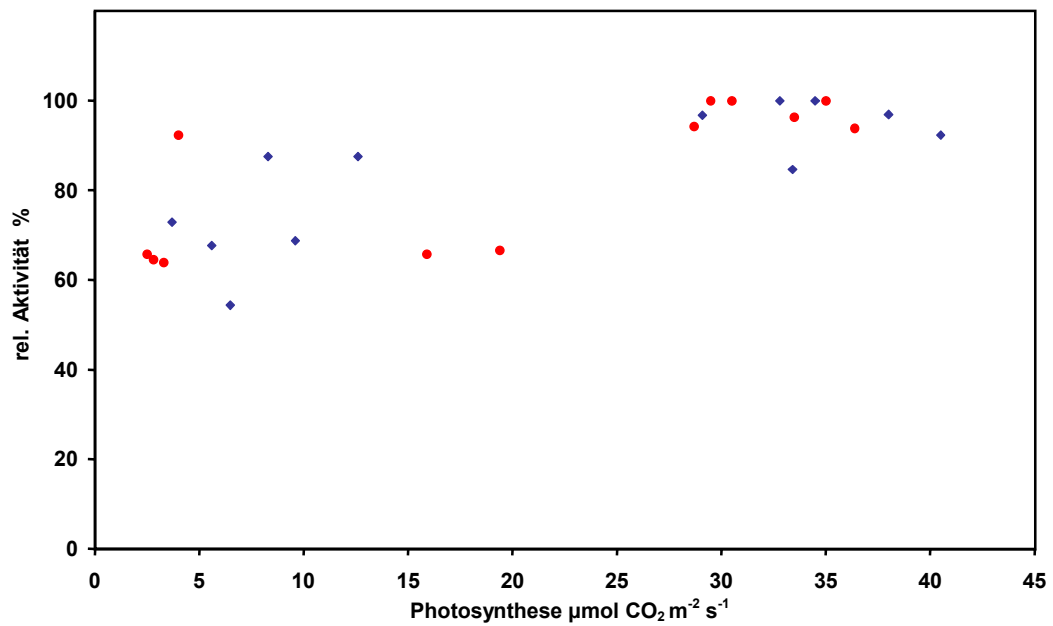


Abb. 3.42: MDH-Aktivierungsgrad in Abhängigkeit von der Photosyntheserate.
Rote Symbole B 35, blaue Symbole E 36.

Der Aktivierungsgrad der Malatdehydrogenase der Kontrollpflanzen lag zwischen 80% und 100% der maximalen Aktivität. Bei Trockenstreß und abnehmender Photosyntheserate sank der MDH-Aktivierungsgrad leicht ab, lag jedoch auch bei stark gestreßten Pflanzen bei etwa 60% der Maximalaktivität. Damit lag die Gesamtaktivität der MDH auch unter Trockenstreß immer über der Photosyntheserate, und eine Limitierung der Photosynthese durch dieses Enzym scheint damit unwahrscheinlich.

3.3.4.4 Decarboxylierendes Malatenzym (ME)

Das Malatenzym katalysiert in den Chloroplasten der Bündelscheidenzellen die Decarboxylierung von Malat, wobei neben CO_2 auch Pyruvat und NADPH entsteht. Die Aktivität des Malatenzyms war bei den Kontrollpflanzen beider Sorten mit ca. $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ etwa doppelt so hoch wie die Photosyntheserate (Abb. 3.43).

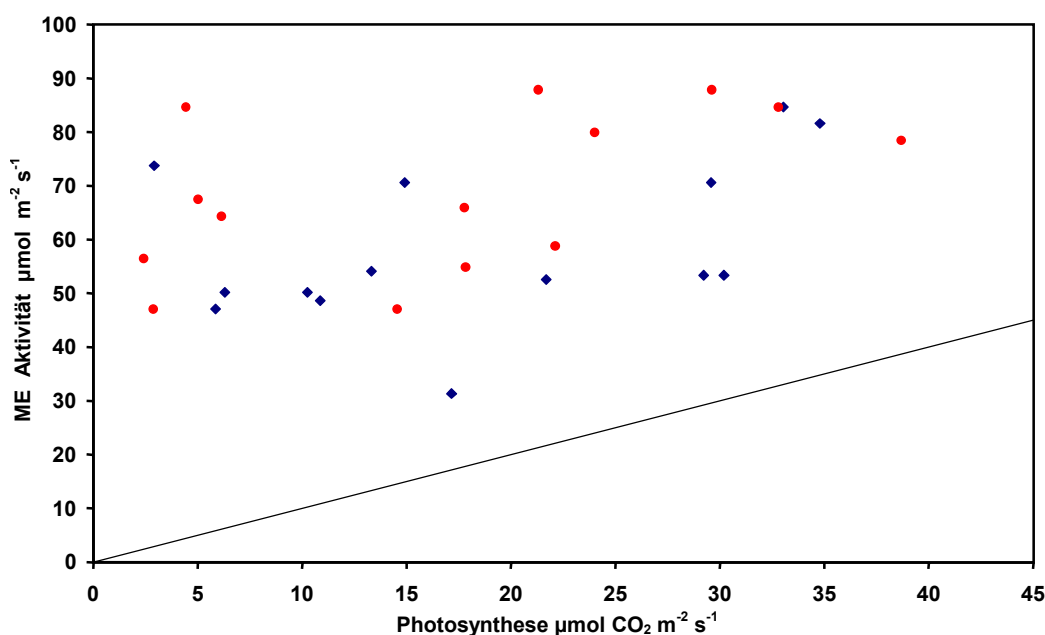


Abb. 3.43: ME-Aktivität in Abhängigkeit von der Photosyntheserate. Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Unter Trockenstreß kam es zu einem leichten, kaum signifikanten Rückgang der Enzymaktivität in beiden Sorten. Die ME-Aktivitäten der trockengestreßten Pflanzen lagen jedoch ca. fünf- bis zwanzigfach über den Photosyntheseraten. Damit scheint die ME-Aktivität ebenfalls nicht der limitierende Faktor der Photosynthese zu sein.

3.3.4.5 Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (Rubisco)

Die Rubisco in den Bündelscheidenchloroplasten ist das carboxylierende Enzym des Calvin-Zyklus. In C_3 -Pflanzen ist die Rubisco für einige Arten, z.B. *Lycopersicon esculentum*, ein Schlüsselenzym, durch dessen Aktivität die Photosynthese limitiert wird (BRÜGGEMANN et al., 1994). Neben der absoluten Aktivität spielt in C_3 -Pflanzen unter natürlichen Bedingungen darüber hinaus oft auch die Substratsättigung mit CO_2 eine entscheidende Rolle für die Carboxylierungsleistung der Rubisco.

Im Gegensatz dazu stellt der CO_2 -Gehalt des Reaktionsmediums in C_4 -Pflanzen normalerweise keinen limitierenden Faktor dar, da er durch die vorgeschaltete Vorfixierung des C_4 -Zyklus etwa um das fünf- bis siebenfache höher liegt als in C_3 -Pflanzen. An diese veränderten Rahmenbedingungen hat sich die Rubisco

der C₄-Pflanzen in der Evolution durch biochemische Veränderungen angepaßt. Die Rubisco von C₄-Pflanzen besitzt eine bis zu doppelt so große spezifische Aktivität wie in C₃-Pflanzen (SEEMANN et al., 1984). Diese höhere Aktivität wird jedoch durch eine höhere Michaelis-Konstante "erkauft", d.h. die CO₂-Konzentrationen des Reaktionsmediums müssen unbedingt höher sein als in C₃-Pflanzen. Ob die Rubisco auch in *Sorghum* einen limitierenden Faktor darstellt, sollte durch die Aktivitätsmessung geklärt werden (Abb. 3.44).

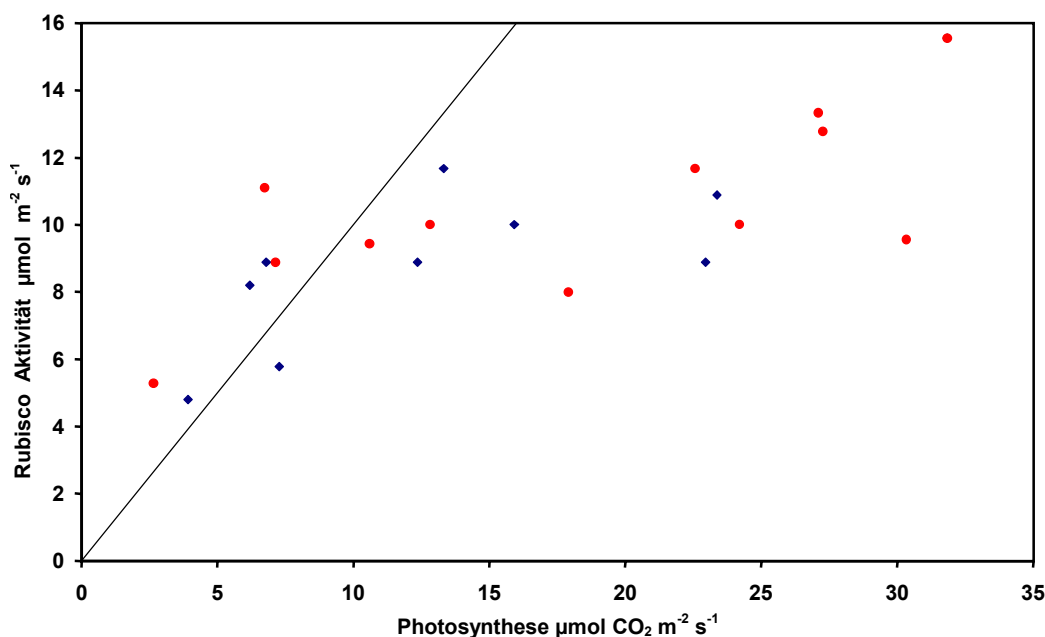


Abb. 3.44: Rubisco-Aktivität in Abhängigkeit von der Photosyntheserate. Rote Symbole B 35, blaue Symbole E 36.

Der Vergleich der Rubisco-Aktivität mit der Photosyntheserate zeigte im Vergleich zu den anderen Enzymaktivitätsmessungen ein völlig anderes Bild. Die meßbaren Rubisco-Aktivitäten lagen in den meisten Fällen deutlich unter den Photosyntheseraten, lediglich bei einigen trockengestreßten Pflanzen mit niedriger Photosyntheserate lagen die Meßpunkte oberhalb der 1:1 Relationsgerade (schwarz). Versuche, die Extraktion oder die Meßmethode zu verändern und so höhere Aktivitäten zu erreichen, schlugen fehl. Da die ermittelten Meßwerte, wie bereits am Anfang beschrieben, unrealistisch sind, mußte eine andere Möglichkeit gefunden werden, die Rubisco-Aktivität in den beiden *Sorghum*-Kultivaren abzuschätzen.

Um herauszufinden, ob die niedrigen Rubisco-Aktivitäten auf einer mangelhaften Extraktion, oder auf einer Inaktivierung während der Homogenisation beruhten, wurden Rubisco-Aktivität und -Gehalt der *Sorghum*-Proben mit Rubiscoextraktionen aus *Lycopersicon esculentum* verglichen, die auf stickstoffarmen Substrat kultiviert wurden. In diesen Pflanzen wird die Photosyntheserate durch die Rubisco-Aktivität limitiert (BRÜGGEMANN et al., 1994); durch einen Vergleich der Rubisco-Menge und -Aktivität ließ sich so die spezifische Aktivität abschätzen. Vergleicht man diese Daten mit den bekannten spezifischen

Rubisco-Aktivitäten beider Arten, kann man herausfinden, worin die Gründe für die niedrigen Rubisco-Aktivitäten der *Sorghum*-Proben zu suchen sind.

Zur Abschätzung des Rubiscopegehaltes wurden die Extrakte, die zur Aktivitätsbestimmung verwendet wurden, einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen (Abb. 3.45).

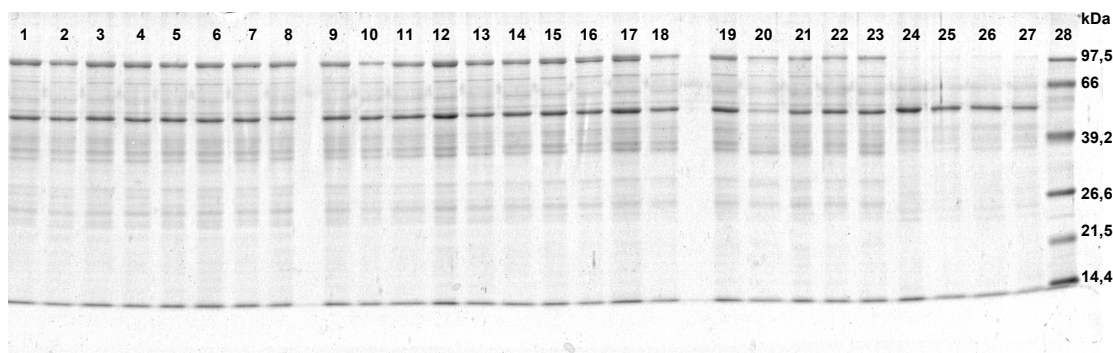


Abb. 3.45: SDS-PAGE aller Sorghum- und Lycopersicon-Proben, Reihe 1-7: trockengestreifte Sorghum E 36, Reihe 8-14: trockengestreifte Sorghum B35, Reihe 15-19: Sorghum E 36 Kontrolle, Reihe 20-23: Sorghum B35 Kontrolle, Reihe 24-27: Lycopersicon, Reihe 28: Längenstandard.

Aufgetragen wurden jeweils 10 µl der in Kap.2.10 beschriebenen Blatthomogenate, wodurch sich blattflächenbezogene Unterschiede der Proteingehalte der einzelnen Banden erkennen lassen sollten.

Zwischen dem Bandenmuster der *Sorghum*- (Reihe: 1-23) und *Lycopersicon*-Proben (Reihe: 24-27) läßt sich ein deutlicher Unterschied erkennen. Besonders auffällig ist dabei das Fehlen einer ca. 97 kDa Bande bei den *Lycopersicon*-Proben.

Zur Identifizierung der Enzyme wurde an zwei identischen Minigelen mit *Sorghum*- und *Lycopersicon*-Proben nach der Gelelektrophorese ein Western-Transfer durchgeführt. Die Membranen wurden anschließend mit einem Antikörper gegen die große Untereinheit der Rubisco und einem PEPCase-Antikörper inkubiert und gefärbt. Damit ließ sich die bei den *Lycopersicon*-Proben fehlende Bande bei 97 kDa als PEPCase identifizieren (Abb. 3.46).

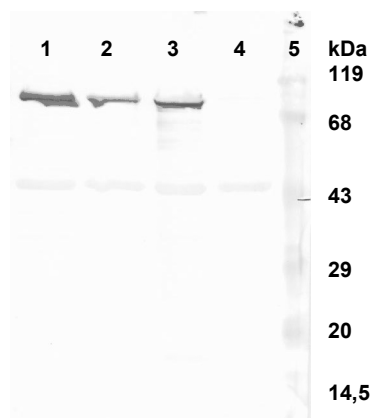


Abb. 3.46: Western Blot mit PEPCase Antikörper; Reihe 1,2: Sorghum (E 36; B35), Reihe 3: Saccharum, Reihe 4: Lycopersicon, Reihe 5 Längenstandard.

Der Antikörper band spezifisch an eine Bande bei etwa 97 kDa, was mit dem in der Literatur (MIZIORKO et al., 1974) angegebenen Molekulargewicht der PEPCase übereinstimmt. Die in der dritten Reihe aufgetragenen Probe von *Saccharum officinale* (Zuckerrohr) zeigte ebenfalls Reaktion mit dem Antikörper. Die *Lycopersicon*-Probe zeigte keine Wechselwirkung mit dem Antikörper, woraus abzuleiten ist, daß das Enzym in den Blättern der Tomate wahrscheinlich nicht oder nur in wesentlich geringerer Konzentration vorkam, als in den Blättern der beiden C₄-Pflanzen. Wie bei dem in Abb. 3.45 gezeigten Gel wurden jeweils wieder gleiche Extraktmengen aufgetragen. Im Gegensatz zu den Proteinbanden im Gel, ließen sich beim immunochemischen Nachweis keine Mengen abschätzen, da die Wechselwirkung des Antikörpers gegen die PEPCase aus unterschiedlichen Arten variieren kann.

Durch den immunochemischen Nachweis mit dem Antikörper gegen die große Untereinheit der Rubisco (*large subunit*) konnte die deutliche Bande bei ca. 55 kDa der Rubisco zugeordnet werden (Abb. 3.47).

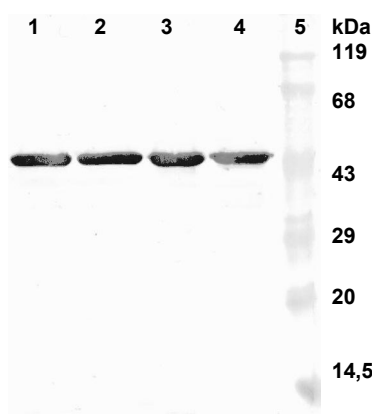


Abb. 3.47: Western Blot mit Rubisco Antikörper, Reihe 1,2: Sorghum (E36; B 35), Reihe 3: Saccharum, Reihe 4: Lycopersicon, Reihe 5 Längenstandard.

Im Gegensatz zum PEPCase-Antikörper, zeigten alle Pflanzen mit dem Rubisco Antikörper eine deutliche Reaktion. Nach der Identifizierung der Rubisco wurde das Gel mit allen Proben gescannt und die Intensität der Rubisco Banden mittels eines Analyseprogramms (Sigma Gel®) bestimmt. Als Referenz für die Proteinmenge dienten dabei die Banden der Markerproteine. Aus den erhaltenen Daten ließ sich der Rubiscopegehalt pro Blattfläche und Gesamtprotein bestimmen (Tab. 3.3).

	mg Rubisco m ⁻²	mg Rubisco/mg Protein
<i>Lycopersicon</i>	398 ± 107	0,9 ± 0,1
<i>Sorghum</i> cv. E 36/B 35 Kontrolle	389 ± 94	0,8 ± 0,1
<i>Sorghum</i> cv. E 36/B 35 gestreßt	379 ± 64	0,5 ± 0,2

Tab. 3.3: Rubiscopegehalt pro Blattfläche und Gesamtprotein.

Da die Werte der beiden *Sorghum*-Kultivare sich nicht voneinander unterschieden, wurden die Werte beider Kultivare in Tab. 3.3 zusammengefaßt. Die Auswertung der Rubiscopegehalte pro Blattfläche zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den blattflächenbezogenen Rubiscopegehalten von *Sorghum* und *Lycopersicon*. Es schien also in den *Sorghum*-Pflanzen nicht zu einem Verlust von Rubisco unter Trockenstreß zu kommen, da C₄-Pflanzen eigentlich geringere Rubiscopegehalte aufweisen sollten als C₃-Pflanzen. Bezieht man die Rubisco Menge auf den Gehalt an löslichen Proteinen, fällt auf, daß die errechneten Werte sehr hoch lagen, was wahrscheinlich auf Fehler bei der Eichung des Analyseprogramms zurückzuführen ist. Somit lassen sich zwar die Proteinmengen untereinander vergleichen, die Kalkulation absoluter Proteingehalte ist jedoch sehr ungenau.

Trägt man die Rubisco-Aktivität der Versuchspflanzen mit der blattflächenbezogenen Enzymmenge gegen die Photosyntheserate auf (Abb. 3.48),

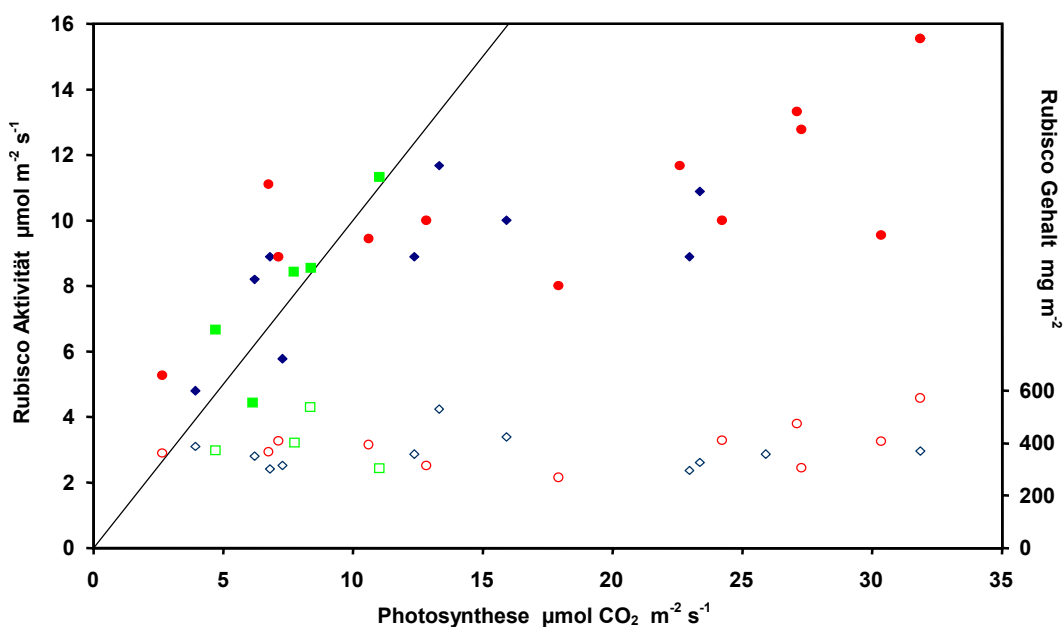


Abb. 3.48: Rubisco-Aktivität und -Gehalt in Abhängigkeit der Photosynthese.
Offene Symbole: flächenbezogener Rubiscopegehalt, geschlossene Symbole: Enzymaktivität;
Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36, grüne Symbole: *Lycopersicon*.

erkennt man, daß die *Lycopersicon*-Extrakte bei gleicher Enzymmenge vergleichbare Aktivität aufwiesen wie die Rubisco aus *Sorghum*. Der leichte Rückgang der Enzymaktivität unter Trockenstreß bei *Sorghum* korrelierte nicht mit einem Rückgang der Rubisco-Menge. Kalkuliert man aus den Enzymmengen und der Aktivität die spezifische Rubisco-Aktivität (Tab. 3.4),

	spez. Aktivität $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$
<i>Lycopersicon</i>	$1,1 \pm 0,3$
<i>Sorghum</i> Kontrolle	$1,5 \pm 0,5$
<i>Sorghum</i> gestreßt	$1,6 \pm 0,4$

Tab. 3.4: Spezifische Rubisco-Aktivität

so liegt diese deutlich unter den publizierten Daten (SEEMANN et al., 1984) für *Sorghum* ($6,6 \pm 0,2$) bzw. *Spinacea* oder *Phaseolus* ($2,8 \pm 0,02$; $3,7 \pm 0,11$) als typische C_3 -Pflanzen, was ein weiterer Hinweis auf die ungenaue Abschätzung der Proteinmenge im SDS-Gel ist.

Der geringe Unterschied zwischen der spezifischen Aktivität der *Sorghum*- und *Lycopersicon*-Proben zeigt jedoch, daß der Grund für die niedrigen gemessenen Rubisco-Aktivitäten bei *Sorghum* wahrscheinlich nicht auf unvollständige Extraktion, sondern auf Inaktivierung während der Extraktion zurückzuführen ist.

3.3.4.6 Fruktose-1,6-bisphosphatase (FBPase)

Neben der Rubisco ist die Fruktose-1,6-bisphosphatase ein weiteres Schlüsselenzym des Calvin Zyklus, das die Reaktion von Fruktose-1,6-bisphosphat zu Fruktose-6-phosphat katalysiert und deren Aktivität im folgenden Diagramm (Abb. 3.49) dargestellt ist:

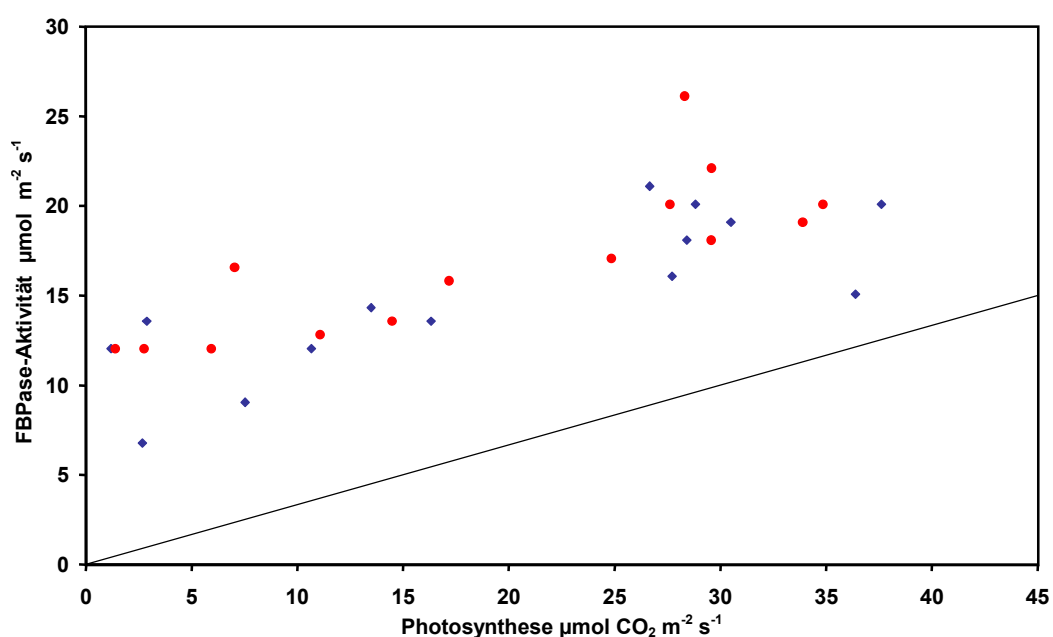


Abb. 3.49: FBPase-Aktivität in Abhängigkeit von der Photosyntheserate. Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Wie bei der Rubisco erkennt man einen Rückgang der Enzymaktivität in den gestreßten Pflanzen. Die Lage der Geraden, welche die Stöchiometrie zwischen Enzymaktivität und Photosynthese beschreibt, ist bei der FBPase anders als bei den zuvor untersuchten Enzymen. Im Gegensatz zur 1:1 Stöchiometrie handelt es sich hier um ein 1:3 Verhältnis zwischen Enzymaktivität und Photosynthese, da nur ein Teil des im Calvin-Zyklus fixierten Kohlenstoffs durch die FBPase umgesetzt wird. Alle gemessenen Enzymaktivitäten lagen über dieser Geraden, so daß die Photosynthese nicht durch die FBPase limitiert zu werden schien. Ein Unterschied in der Enzymaktivität, durch den sich die abweichenden Photosyntheseraten der beiden Sorten unter Streß erklären ließen, war wie auch bei der Rubisco nicht erkennbar.

3.3.5 Pigmentanalyse

Die Unterschiede der nicht-photochemischen Löschungparameter q_n , bzw. q_f bei den Chlorophyllfluoreszenz-Messungen zwischen E 36 und B 35 (sieh. Kap. 3.3.3), ließen vermuten, daß es möglicherweise Unterschiede in der Reaktion des Xanthophyllzyklus auf Trockenstreß gibt.

Aus diesem Grund wurde an gestreßten Pflanzen und Kontrollpflanzen eine Pigmentanalyse mit Hilfe der HPLC (Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie) durchgeführt. Dadurch ließen sich die einzelnen Carotinoide voneinander trennen und ihre jeweiligen Anteile bestimmen, was bei der spektralphotometrischen Bestimmung des Carotinoidgehaltes nach RÖBBELEN (1957) nicht möglich war. Belichtet man vor-verdunkelte Pflanzen unterschiedlich lange und bestimmt anschließend die Pigmentzusammensetzung, lassen sich daraus Aussagen zur Kinetik der Deepoxidation des Xanthophyllzyklus treffen (Abb. 3.50/3.51). Die Belichtung erfolgte dabei mit der gleichen Lichtintensität ($400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) wie bei den Chlorophyllfluoreszenz-Messungen und der Pflanzenanzucht.

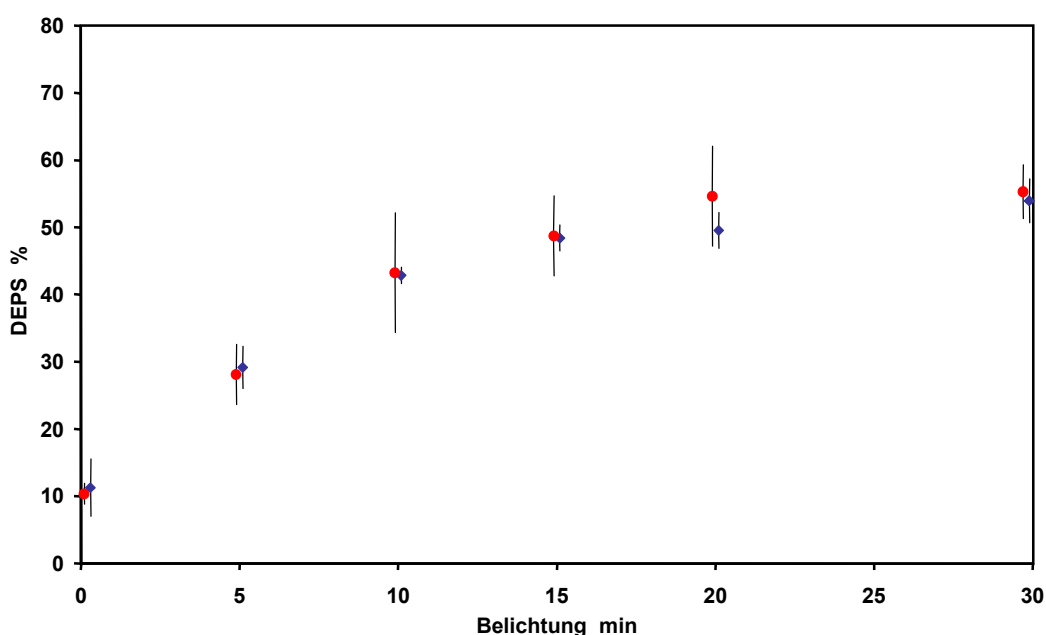


Abb. 3.50: Kinetik der Deepoxidation der Kontrollpflanzen in Abhängigkeit von der Belichtungsdauer ($400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Der Deepoxidationsstatus (DEPS) der Kontrollpflanzen stieg mit andauernder Belichtung von etwa 10% zu Versuchsbeginn, auf maximal ca. 55% an. Der maximale Deepoxidationsgrad wurde dabei nach etwa 20 minütiger Belichtung erreicht und blieb unter fortdauernder Belichtung konstant. Beide Sorten zeigten einen identischen Kurvenverlauf. Auffällig war der hohe Deepoxidationsgrad der Pflanzen zu Versuchsbeginn. Da dieser deutlich über den in der Literatur angegebenen Werten für C_3 -Pflanzen liegt (z.B. BRÜGGEMANN und KOROLEVA, 1995) wurden die Pflanzen probeweise bis zu 12 h vor Versuchsbeginn in Schwachlicht ($< 10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) überführt, wodurch jedoch auch kein niedrigerer Deepoxidationsstatus erreicht wurde.

Im Gegensatz zu den Kontrollpflanzen ließen sich bei den gestreßten Pflanzen Unterschiede zwischen beiden Sorten erkennen (Abb. 3.51).

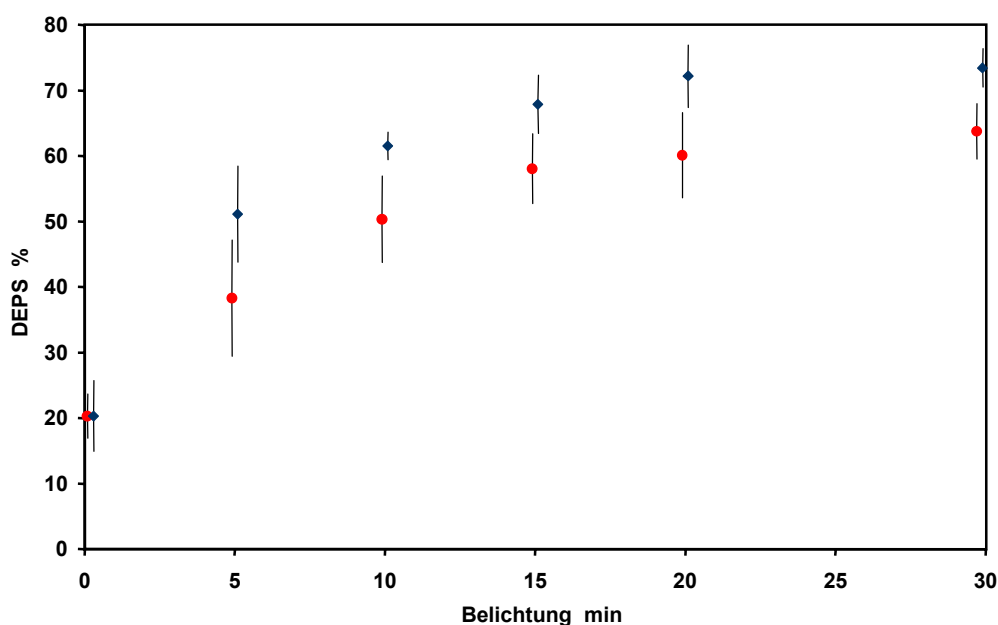


Abb. 3.51: Kinetik der Deepoxidation gestreßter Pflanzen in Abhängigkeit von der Belichtungsdauer ($400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Rote Symbole: B 35; blaue Symbole: E 36.

Die gestreßten Pflanzen beider Sorten wiesen zu Versuchsbeginn ($t=0$) einen etwa doppelt so hohen Deepoxidationsgrad auf wie die Kontrollpflanzen. Die Kinetik der Deepoxidation war bei der Sorte B 35 ähnlich wie bei den Kontrollpflanzen, nur war die Kurve bei den gestreßten Pflanzen um ca. 10% nach oben verschoben. Der maximale Deepoxidationsgrad lag mit 63% ebenfalls etwa 10% über dem Wert der Kontrollpflanzen.

Im Vergleich dazu stieg der Deepoxidationsgrad bei der Sorte E 36 schneller an als in den Kontrollpflanzen und lag mit einem maximalen Deepoxidationsgrad von 73% ungefähr 20% über den Kontrollpflanzen und 10% über dem Wert der gestreßten B 35.

Trockenstreß führte also in beiden *Sorghum*-Kultivaren zu einer Adaption des VAZ-Zyklus, der einen höheren Deepoxidationsstatus unter Trockenstreß aufwies. Die Sorte E 36 zeigte dabei eine schnellere

Deepoxidation und einen etwas höheren Deepoxidationsgrad. Diese Daten widersprechen jedoch der anhand der Fluoreszenzdaten angestellten Vermutung, daß die geringeren nicht-photochemischen Löschungskoeffizienten q_n , bzw. q_f der Sorte E 36 durch eine geringere Leistungsfähigkeit der Violaxanthin-Deepoxidation verursacht würden.

Da neben der Geschwindigkeit des Umsatzes von Violaxanthin zu Zeaxanthin auch die absolute Pigmentmenge Einfluß auf die Fähigkeit zur Wärmeabstrahlung haben könnte, wurde auch die Pigmentverteilung von Kontrollpflanzen und gestreßten Pflanzen miteinander verglichen (Abb. 3.52):

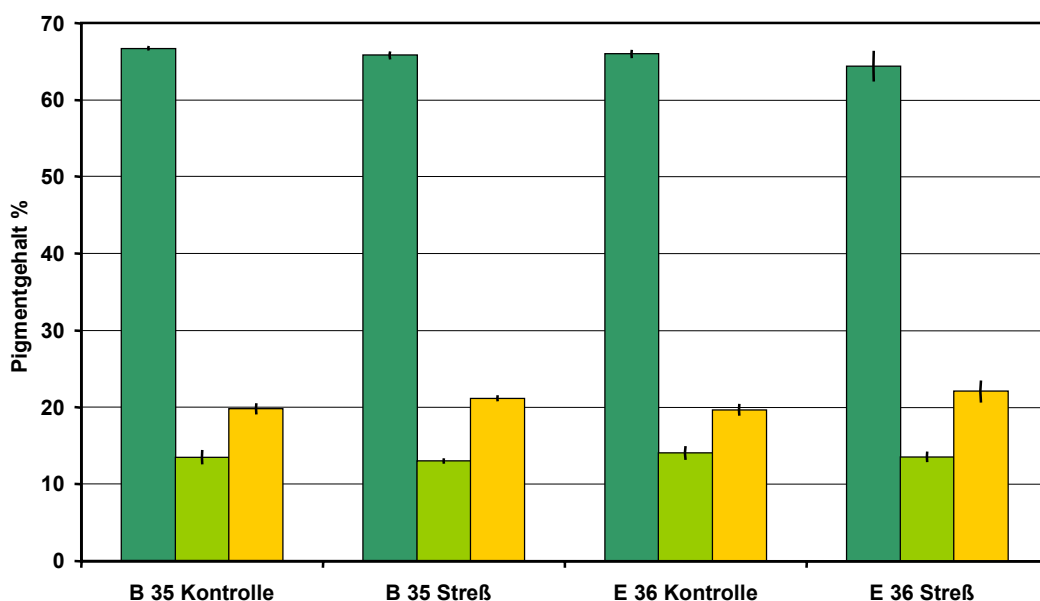


Abb. 3.52: Pigmentverteilung in Kontrollpflanzen und gestreßten Pflanzen.
Dunkelgrüne Balken: Chl. a, hellgrüne Balken: Chl. b, gelbe Balken: Gesamt-Carotinoide.

Zwischen den gestreßten Pflanzen und den Kontrollen gab es in beiden Sorten keine signifikanten Unterschiede. Das dominierende Pigment war Chlorophyll a mit einem Anteil von etwa 66% der Gesamtpigmente. Der Chlorophyll b Anteil lag mit ca. 14% deutlich niedriger, wodurch sich rechnerisch ein Chl. a/b-Verhältnis von ungefähr 4,7 ergibt. Das liegt deutlich über den Verhältnissen, die sich aus den spektralphotometrischen Chlorophyllbestimmung nach ARNON (1949) ergeben (siehe Tab. 3.1). Der Grund für die unterschiedlichen Werte liegt vermutlich in den verwendeten Wellenlängen der jeweiligen Messungen. Während die Chlorophyllbestimmung nach ARNON (1949) am jeweiligen Absorptionsmaximum von Chl. a und b durchgeführt wurde, erfolgte die Pigmentmessung an der HPLC im Absorptionsbereich der Carotinoide und war somit für die Chlorophylle ungenauer (LICHTENTHALER, 1987). Dies ist wahrscheinlich auch die Erklärung für die verhältnismäßig hohen Carotinoidgehalte, die mit ca. 20% etwa doppelt so hoch liegen wie bei den spektralphotometrischen Messungen.

Vergleicht man die Werte der einzelnen Carotinoide untereinander, so ergibt sich folgendes Bild (Abb. 3.53):

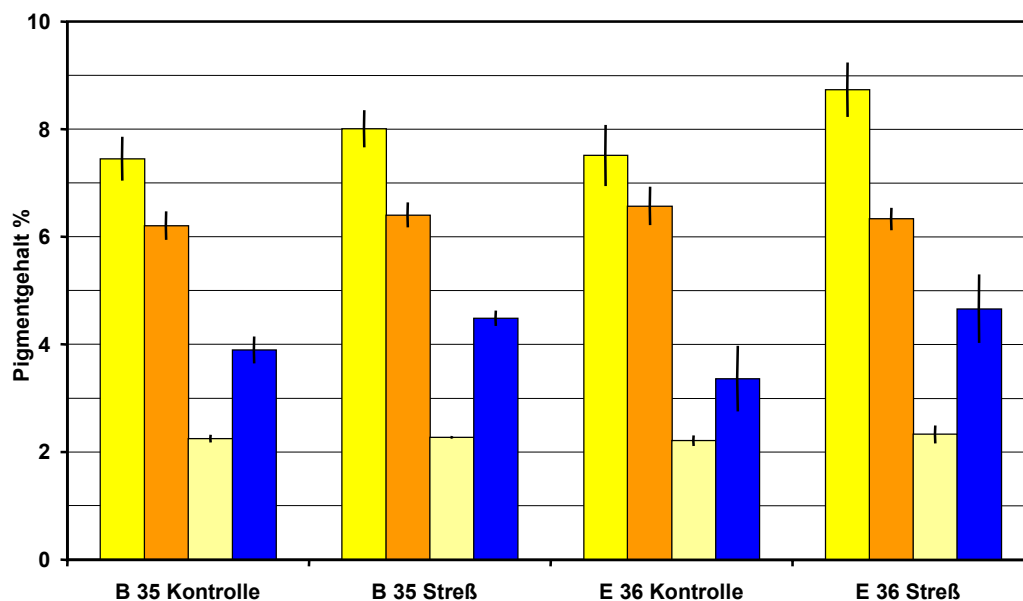


Abb. 3.53: Carotinoidverteilung in Kontrollpflanzen und gestreßten Pflanzen. Hellgelbe Balken: Lutein, orange Balken: β -Carotin, blaßgelbe Balken: Neoxanthin, blaue Balken: VAZ-Pigmente.

Das dominierende Pigment der Carotinoide war das Lutein (hellgelb), dessen Anteil in beiden Kultivaren unter Trockenstreß leicht anstieg. Das zweithäufigste Pigment war das β -Carotin (orange Balken), dessen Gehalt unter Streß relativ konstant bleibt, wie auch der Anteil von Neoxanthin (blaßgelb). Der Pigmentanteil des VAZ-Zyklus (blau) nahm in beiden Sorten unter Streß leicht zu und stieg von 3,9% auf 4,5% (B 35), bzw. von 3,4% auf 4,7% (E 36) an. Zwischen beiden Sorten bestand also kein signifikanter Unterschied in der Pigmentzusammensetzung, durch den sich das unterschiedliche Verhalten der Photosynthese unter Trockenstreß erklären ließe.

3.3.6 C₄-Metabolite

Neben der Enzymaktivität könnte auch der Metabolitgehalt des C₄-Stoffwechsels regulativ auf die Photosynthese wirken. Sinkt der Spiegel einiger Bestandteile, so könnte dies zu einer mangelhaften Substratsättigung von Enzymen führen. Dadurch würde es zu einem Absinken der Umsatzraten unter einen kritischen Wert kommen und eine Limitierung der Photosynthese zur Folge haben. Andererseits könnte eine Akkumulation einzelner Metabolite wie z.B. Oxalacetat und Malat zu einer Endprodukthemmung der PEPCase führen.

Malat

Abbildung 3.53 zeigt die Malatkonzentration pro Frischgewicht:

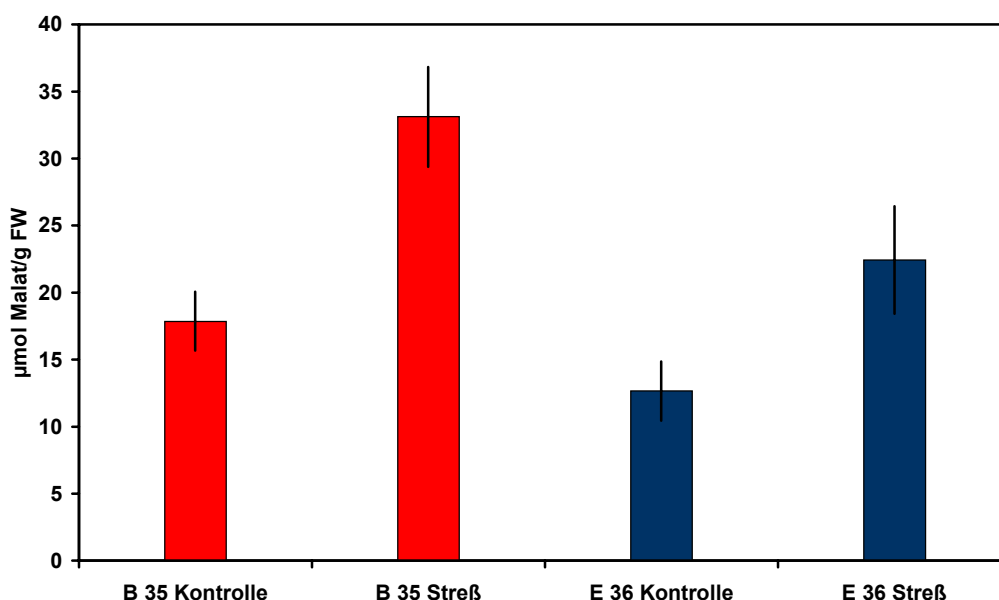


Abb. 3.54: Malatgehalt pro Frischgewicht in Kontrollpflanzen und gestreßten Pflanzen.

Trockenstreß führte in beiden Kultivaren zu einem Anstieg des Malatgehaltes. Es ließ sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Sorten erkennen. Der Malatgehalt der Sorte B 35 lag in den Kontrollpflanzen mit ca. 18 µmol/g FW etwa um ein Drittel höher als in den Kontrollen von E 36 (12,7 µmol/g FW). In den gestreßten Pflanzen stieg der Malatgehalt in B 35 um etwa 80% auf 33 µmol/g FW an. Auch in den gestreßten Pflanzen der Linie E 36 kam es zu einem Anstieg des Malatgehaltes um etwa 73% auf 22 µmol/g FW an.

Pyruvat

Im Gegensatz zu den Malatgehalten ließen die Pyruvatkonzentration keine signifikanten Änderungen zwischen den Kontrollen und den gestreßten Pflanzen erkennen (Abb. 3.54).

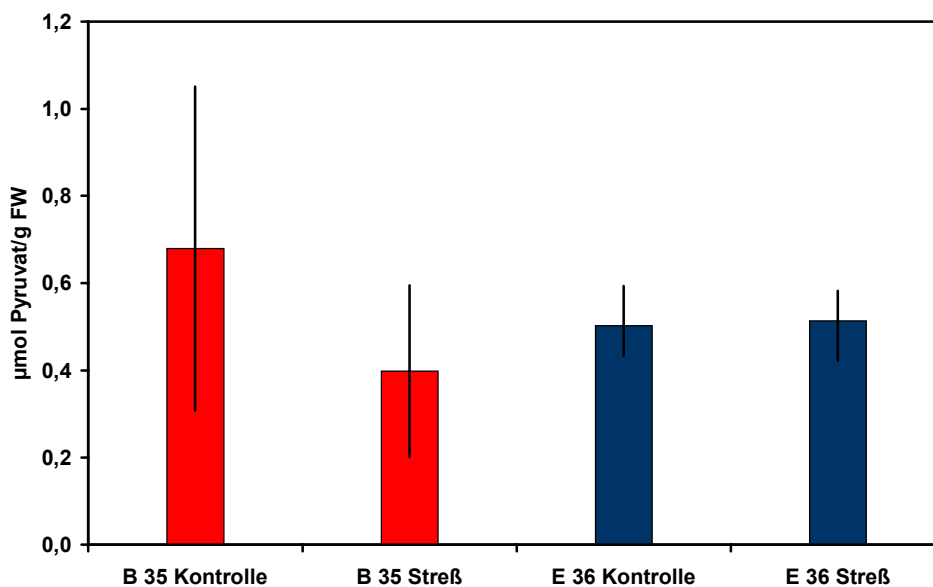


Abb. 3.55: Pyruvatgehalt pro Frischgewicht in Kontrollpflanzen und gestreßten Pflanzen.

Tendenziell war bei den gestreßten Pflanzen der Sorte B 35 eine leichte Abnahme des Pyruvatgehaltes zu erkennen, jedoch war dies aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant. Zwischen den Kontrollen und den gestreßten E 36 Pflanzen gab es keine Unterschiede. Die gemessenen Pyruvatkonzentrationen lagen deutlich niedriger als die Malatgehalte.

Oxalacetat

Abbildung 3.55 zeigt den Oxalacetatgehalt:

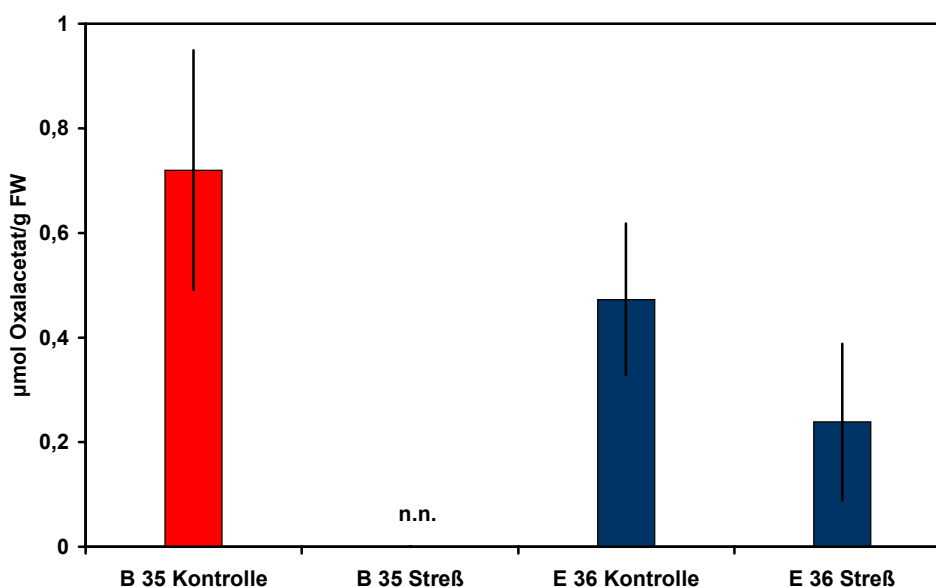


Abb. 3.56: Oxalacetatgehalt pro Frischgewicht in Kontrollpflanzen und gestreßten Pflanzen.
n.n.: nicht nachweisbar.

Die Gehalte für Oxalacetat wie auch Pyruvat lagen verglichen mit den Malatkonzentrationen deutlich niedriger und betrugen nur etwa 1/50-1/100 der Malatgehalte. Die Oxalacetatgehalte der gestreßten Pflanzen lagen unter den Kontrollwerten, bei den gestreßten Pflanzen der Sorte B 35 war der Gehalt so niedrig, daß er durch den verwendeten Enzymtest nicht mehr nachzuweisen war (Nachweisgrenze: 0,05 µmol/g FW). Trotz der hohen Standardabweichung und der niedrigen Meßwerte läßt sich bei der Betrachtung der Meßwerte jedoch ein gewisser der Trend zu sinkenden Oxalacetatkonzentrationen unter Streß erkennen.

PEP

Ähnlich wie bei den Oxalacetatgehalten war auch der Phospho-*enol*-pyruvat-Gehalt (Abb.3.56) im Vergleich zu Malat und Pyruvat sehr gering.

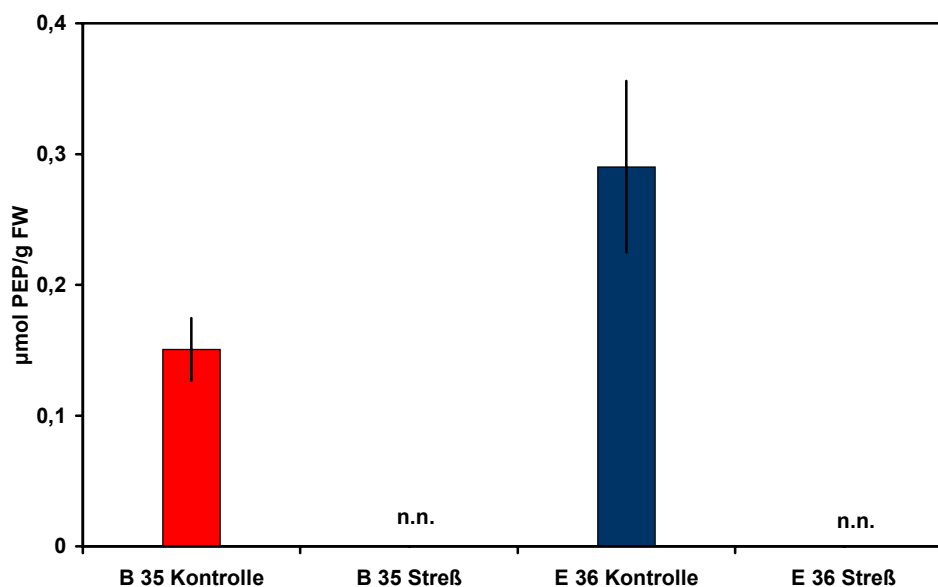


Abb. 3.57: PEP-Gehalt pro Frischgewicht in Kontrollpflanzen und gestreßten Pflanzen.
n.n.: nicht nachweisbar.

In beiden Kultivaren war bei den gestreßten Pflanzen mit dem verwendeten Enzymtest kein Phospho-*enol*-pyruvat mehr nachweisbar (Nachweisgrenze: 0,05 µmol/g FW). Im Gegensatz zum Oxalacetat schienen die PEP-Gehalte der Sorte E 36 unter Kontrollbedingungen über denen der Sorte B 35 zu liegen.

Trotz der hohen Standardabweichungen und den z.T. sehr geringen Metabolitkonzentrationen, läßt sich aus den gewonnenen Daten ein Effekt des Trockenstresses auf die Metabolitverteilung des C₄-Stoffwechsels erkennen: Dabei steigt der Malatgehalt an, Oxalacetat und Phospho-*enol*-pyruvat nehmen ab, während der Pyruvatgehalt unverändert bleibt, was ein Hinweis auf einen eventuellen Rückstau durch Störungen im nachgeschalteten Kohlenstoffmetabolismus sein könnte.

4 Diskussion

4.1 Bewertung des verwendeten Modellsystems

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand in der Etablierung eines Systems, welches es erlaubte, Pflanzen einem reproduzierbaren Trockenstreß auszusetzen. Darüber hinaus sollte das System leicht zu handhaben und kostengünstig sein. In der Literatur über Arbeiten mit Trockenstreß finden sich zahlreiche Modelle, die sich z.T. sehr stark voneinander unterscheiden. Prinzipiell lassen sich die verwendeten Modelle in drei Klassen unterteilen:

In der ersten Klasse erfolgt die Anzucht der Pflanzen im Freiland unter natürlichen Bedingungen, der Trockenstreß wird durch Beenden oder Begrenzen der Bewässerung ab einem gewissen Alter der Pflanzen ausgelöst (BLUM et al., 1989; KIDAMBI et al., 1990; WINKEL et al., 1997; JONES et al., 1995).

Bei den Modellen der zweiten Klasse erfolgt die Kultivierung der Pflanzen zumeist in Treibhäusern oder Klimakammern unter mehr oder weniger konstanten äußeren Bedingungen, die Pflanzen wachsen dabei in Pflanzgefäßen mit Erde oder auf künstlichen Substraten, die ab einem gewissen Zeitraum nicht mehr bewässert werden (DU et al., 1996; MASOJIDEK et al., 1991)

Im Gegensatz zu den beiden ersten Modellen erfolgt die Kultivierung der Pflanzen in der dritten Klasse nicht mehr auf natürlichem Substrat, sondern in Wasser, welches alle erforderlichen Nährstoffe enthält. Der Trockenstreß wird dabei durch Zugabe osmotisch wirksamer Substanzen (PEG, Kochsalz, Sorbit) initiiert. Normalerweise erfolgt die Anzucht dabei ebenfalls in einem Gewächshaus oder einer Klimakammer (JAGTAP et al., 1995, 1998).

Alle drei verwendeten Modelle haben Vor- und Nachteile. Ein Vorteil von Freilandversuchen sind die geringen Kosten und ein zumeist sehr großes Platzangebot, welches eine hohe Stichprobenzahl ermöglicht. Einen großen Nachteil stellen jedoch Umwelteinflüsse dar (z.B. Licht, Temperatur, Nährstoffversorgung), die durch Trockenstreß ausgelöste Effekte überlagern können. Insbesondere in regenreichen und kühlen Regionen lassen sich Freilandversuche zu Trockenstreß mit tropischen Pflanzen aus diesem Grund nur schwer realisieren.

Das direkte Gegenteil dazu stellt die Pflanzenanzucht auf Wasserkultur in einer Klimakammer dar. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Kontrolle der Wachstumsfaktoren (Licht, Temperatur, Nährstoffe etc.) und in der Möglichkeit die Stärke des Trockenstresses durch osmotisch wirksame Substanzen genau bestimmen zu können. Nachteil dieser Methode sind, neben großem Arbeitsaufwand, hohe Kosten für Betriebsmittel. Durch die jeweiligen osmotischen Substanzen kann es darüber hinaus zu Toxizität (NaCl) oder Befall durch Mikroorganismen (Sorbit, PEG) kommen, welche die Meßergebnisse beeinflussen.

Einen guten Kompromiß stellt daher die Anzucht der Versuchspflanzen in einer Klimakammer auf Erdsubstrat dar, wie sie im Rahmen dieser Arbeit praktiziert wurde. Durch konstante äußere Bedingungen können Umwelteinflüsse auf die Meßergebnisse minimiert werden, die Anzucht in Kunststofftöpfen mit Erde stellt eine relativ natürliche Umgebung für die Rhizosphäre dar. Der Nachteil dieser Methode liegt in

der beschränkten Verfügbarkeit von Wasser in den abgeschlossenen Kunststoffbehältern, durch die das Wasserpotential der Erde in sehr kurzer Zeit stärkeren Veränderungen unterliegt als in natürlichen Böden. Dieser schnell eintretende Trockenstreß bewirkt möglicherweise andere biochemische und physiologische Reaktionen als ein langsam steigender Trockenstreß, an den die Pflanze sich adaptieren könnte. Aus den schnellen Veränderungen des Wasserpotentials des Bodens ergab sich für die durchgeführten Experimente das Problem, daß die morgens untersuchten Pflanzen häufig deutlich weniger gestreßt waren als Pflanzen, mit denen am nachmittag gearbeitet wurde. Deshalb wurde zur Überprüfung des tatsächlichen Stresses das Blattdruckpotential als interner Standard bei allen Pflanzen bestimmt.

Effekte morphologischer Anpassungen auf den Trockenstreß, wie z.B. verstärktes Wurzelwachstum, konnten aufgrund des eingeschränkten Wurzelraums und der kurzen Streßperiode ebenfalls nicht untersucht werden.

Einen weiteren wichtigen Faktor für die Reaktionen der Pflanze auf Streß stellt das Alter der verwendeten Versuchspflanzen dar. Messungen an Keimlingen, wie z.B. bei JAGTAP und BHARGAVA (1995), erleichtern die Pflanzenanzucht, können aber evtl. aufgrund anderer physiologischer Reaktionen zu anderen Ergebnissen führen als Messungen an älteren Pflanzen. Für Untersuchungen zum Einfluß von Trockenstreß auf den Ertrag ist eine Kultivierung über die komplette Vegetationsperiode erforderlich. Insbesondere während bzw. nach der Blüteperiode bewirkt Wassermangel bei empfindlichen *Sorghum*-Sorten reduzierte Samengröße, geringeren Ertrag, vorzeitige Blattseneszenz und veränderten Stärkemetabolismus (TUINSTRA et al., 1996), was zu intensiven Arbeiten an Inzuchtlinien geführt hat, deren Eltern sich hinsichtlich dieser Eigenschaften voneinander unterscheiden (LUDLOW et al., 1990; DUNCAN et al., 1981; PREMACHANDRA et al., 1994; TUINSTRA et al., 1997; SANCHEZ et al., 2002).

Die in dieser Arbeit verwendeten Pflanzen waren etwa drei Wochen alt, erlaubten Messungen an vollständig ausdifferenzierten Blättern und ermöglichten aufgrund der kurzen Kultivierung hohe Durchsatzraten.

4.2 Auswahl der *Sorghum*-Kultivare

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *Sorghum*-Kultivare sind in ihren physiologischen Eigenschaften z.T. bereits in der Literatur beschrieben worden. Dabei sind die Sorten E 36, CSV 5 und IS 22380 von JAGTAP et al. (1995; 1998) miteinander verglichen worden, wobei die Sorte E 36 und IS 22380 als trockentolerant, die Sorte CSV 5 als trockensensitiv eingestuft wurden. Die beiden amerikanischen Kultivare B 35 und TX 7078 wurden in Arbeiten von PREMACHANDRA et al. (1994) und TUINSTRA et al. (1997) beschrieben. Dabei wurde die Sorte B 35 als sensitiv und die Sorte TX 7078 als tolerant charakterisiert. Über die *Sorghum*-Sorte R 16, die von ICRISAT (Internationales Institut für den Pflanzenanbau in den semi-ariden Tropen, Indien) als trockentolerant beschrieben wurde, lagen keine vergleichenden Studien vor.

Aufgrund des fehlenden direkten Vergleichs zwischen allen Kultivaren und den unterschiedlichen Kultivierungstechniken in der Literatur, wurden in Vorversuchen die trockentoleranteste und trockenempfindlichste Sorte ausgewählt, da umfassende Untersuchungen an allen sechs zur Verfügung stehenden Kultivaren im Rahmen dieser Arbeit zu aufwendig gewesen wären. Im Vergleich der Photosyntheseleistung unter gleichen Testbedingungen ergab sich die Reihenfolge E 36 > R 16 > CSV 5 > TX 7078 > IS 22380 > B 35, weshalb für die weiteren Versuch die Sorte E 36 als trockentolerante und B 35 als trockensensitive Sorte ausgewählt wurden. Mit Ausnahme der von JAGTAP et al. (1995; 1998) als empfindlich eingestuften Sorte CSV 5, konnten die Einzelergebnisse der anderen Arbeitsgruppen bezüglich der Trockenstreßtoleranz bestätigt werden.

4.3 Vergleich der Kultivare E 36 und B 35

4.3.1 Phänotypische Effekte

Unter den gewählten Versuchsbedingungen kommt es zu einer verhältnismäßig schnellen Änderung des Wasserpotentials der Versuchspflanzen, wodurch langsam auftretende Veränderungen und Anpassungen der Pflanzenmorphologie an die veränderten Umweltbedingungen im Rahmen dieser Arbeit nicht oder nur in Ansätzen beobachtet werden konnten.

Der Wassermangel führte etwa 48 h nach der letzten Bewässerung zu einem Welken der Blätter, welches an den Blattspitzen begann. Im weiteren Verlauf des Trockenstresses kam es insbesondere bei der Sorte B 35 zu einem Zusammenrollen der Blätter. Durch diesen Mechanismus wird die transpirierende Oberfläche verringert, wodurch der Wasserverlust sinkt. Darüber hinaus wird auch die lichtabsorbierende Fläche reduziert. Dies dient insbesondere bei hohen Lichtintensitäten dem Schutz des Photosyntheseapparates (CORLETT et al., 1994). Eine signifikante Erhöhung der Stomatazahl unter Trockenstreß wie sie von TUMANOW (1927) bei *Phaseolus vulgaris* beschrieben wurde, ist bei beiden Kultivaren nicht zu beobachten, was auf die kurze Streßperiode zurückzuführen ist. Interessant ist die etwas höhere Anzahl von Stomata auf der Blattoberseite bei E 36, da die Transpiration mit zunehmender Stomatazahl feiner reguliert werden kann (TUMANOW, 1927), jedoch sind die Unterschiede wahrscheinlich zu gering, um nachhaltigen Einfluß auf die Transpirationskontrolle auszuüben.

Einen wesentlich größeren Anteil an der Einschränkung der Transpiration hat dagegen das Absterben größerer Bereiche der älteren Blätter bei der Sorte E 36. Durch diesen Prozeß wird die transpirierende Oberfläche drastisch reduziert und so der Wasserverlust minimiert. Ähnliche Prozesse wurden z.B. für Baumwolle (*Gossypium hirsutum*) beschrieben, die unter Trockenstreß ihre transpirierende Oberfläche durch Abwurf ihrer Blätter reduzierte (QUISENBERRY et al., 1985) und bei erneuter Bewässerung wieder austrieb. Ein Abwurf der Blätter ist jedoch bei *Sorghum* und anderen halmbildenden Poaceen aufgrund der Anatomie nicht möglich. Vergleicht man die Welk- und Seneszenzprozesse der beiden *Sorghum*-Kultivare, werden zwei unterschiedliche Strategien deutlich: Die Sorte E 36 reduziert ihre Blattfläche unter Trockenstreß durch Absterben der alten Blätter, erhält aber hohe Photosyntheseraten und Wachstum in

den jungen Blättern. Die Sorte B 35 zeigt deutlich weniger Seneszenzerscheinungen der Blätter und welkt gleichmäßig. Dieser Prozeß betrifft auch die unentwickelten Blätter, die bei der Sorte B 35 häufig eingerollt und welk wurden, wohingegen dies auch bei extrem stark gestreßten Pflanzen der Sorte E 36 nicht passierte.

4.3.2 Gaswechselraten

Der Gasaustausch der Pflanze wird durch die Schließweite der Stomata reguliert. Da ca. 70 - 95% der Transpiration über die Stomata erfolgen, stellt das Schließen der Spaltöffnungen einen wirksamen Verdunstungsschutz dar, wie er bei den gestreßten Pflanzen zu beobachten ist (Abb.3.16). Die Spaltöffnungsweite wird dabei durch verschiedenen Faktoren bestimmt und unterliegt einer komplexen Regulation. Die wichtigen Stellglieder für die Regulation sind neben dem Wasserhaushalt der Pflanze vor allem der CO₂-Gehalt im Blattinneren, daneben spielt z.B. auch Blaulicht eine Rolle in der Regulation. Der Wasserhaushalt der Pflanze wirkt dabei auf unterschiedliche Weise: sinkt das Blattdruckpotential des Blattes durch starke Transpiration am Tag stark ab, kommt es durch den allgemeinen Turgorverlust zum Schließen der Stomata, was als hydropassives Schließen bezeichnet wird. Tritt der Trockenstreß an der Wurzel auf, wird Abscisinsäure in der Wurzel synthetisiert und führt in den Blättern zum Schließen der Stomata (CORNISH und ZEEVAARD, 1985), auch wenn diese noch voll turgeszent sind. Dieser hydroaktiv genannte Vorgang findet auch dann statt, wenn nur ein Teil der Wurzel Trockenstreß ausgesetzt wird und Abscisinsäure bildet (BLACKMAN und DAVIS, 1985).

Vergleicht man die in dieser Arbeit ermittelten Daten für die stomatäre Leitfähigkeit miteinander, dann ist die Leitfähigkeit der Sorte E 36 unter Streß deutlich größer als die der Sorte B 35. Im Vergleich mit Werten anderer Arbeitsgruppen (MASSACCI et al., 1996; PREMACHANDRA et al., 1994; JONES et al. 1995; TEWOLDE et al. 1993) liegen die gemessenen Werte für Kontrollpflanzen und gestreßte Pflanzen auf ähnlichem Niveau. Geringfügige Abweichungen zu den Daten anderer Arbeitsgruppen ergeben sich aus den unterschiedlichen Versuchsbedingungen, wie z.B. abweichende Umweltbedingungen (Luftfeuchte, Beleuchtung) und dem unterschiedlichen Pflanzenalter. Auffällig sind die Streuungen bei den Werten der Kontrollpflanzen, die auf verschiedene Regulatoren der stomatären Leitfähigkeit hinweisen.

Weitgehende Übereinstimmungen zu den Ergebnissen der o.g. Arbeitsgruppen finden sich auch bei den ermittelten Photosyntheseraten, die zwischen 55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LAISK und EDWARDS, 1998) und 29 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PREMACHANDRA et al., 1994) für Kontrollpflanzen liegen. Mit sinkendem Blattdruckpotential geht die Photosynthese zurück (siehe Abb.3.15) und ist ab einem Blattdruckpotential von ca. -17 bar in der Sorte B 35 nicht mehr meßbar. Im Gegensatz dazu läßt sich in den gestreßten Pflanzen der Sorte E 36 auch bei Blattdruckpotentialen unter -17 bar noch CO₂-Aufnahme messen. Im Vergleich der Daten für die Sorte B 35 mit Literaturwerten, liegen die in dieser Arbeit ermittelten Photosyntheseraten unter Streß niedriger als die von PREMACHANDRA et al. (1994) publizierten, was möglicherweise auf unterschiedliche Meßbedingungen (Pflanzenalter, Freilandversuch) zurückzuführen

ist. Durch die starke Korrelation von Photosyntheserate und stomatärer Leitfähigkeit, welche für beide untersuchten Sorten gleich ist (siehe Abb.3.17), liegt der Schluß nahe, daß die Photosyntheserate in *Sorghum bicolor*, wie in C₃-Pflanzen, durch den stomatären Widerstand für nachströmendes CO₂ limitiert wird. Dabei sinkt der interzelluläre CO₂-Gehalt so stark ab, daß die CO₂-Sättigung des carboxylierenden Enzyms (C₃: Rubisco; C₄: PEPCase) unterschritten wird und es zu einer Substratlimitierung der Photosynthese kommt.

Gegen diesen, von vielen Autoren (z.B. CORNIC, 2000; MASSACCI et al., 1996; ACKERSON et al., 1980) favorisierten Mechanismus sprechen jedoch vor allem die in dieser Arbeit ermittelten interzellulären CO₂-Konzentrationen (Abb.3.19). Unter gleichbleibendem CO₂-Gehalt des Meßgases (400-450 ppm) liegen die ermittelten interzellulären CO₂-Konzentrationen in Kontrollpflanzen und gestreßten Pflanzen beider Kultivare etwa zwischen 150 und 300 ppm. Würde das CO₂-Angebot die Photosynthese limitieren, sollten in den gestreßten Pflanzen deutlich niedrigere CO₂-Gehalte auftreten, als in den Kontrollpflanzen.

Abb. 3.23 zeigt die Photosyntheseraten in Abhängigkeit der interzellulären CO₂-Konzentration. Man erkennt, daß die CO₂-Sättigung der Photosynthese für die Kontrollpflanzen und gestreßte Pflanzen bei ca. 150-200 ppm liegt, wie dies auch für Mais beschrieben wurde (LEEGOOD und von CAEMMERER, 1989). Mangelnde CO₂-Versorgung scheint also unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht zum limitierenden Faktor der Photosynthese zu werden. Vergleicht man die interzellulären CO₂-Gehalte der beiden Kultivare unter Streß miteinander, dann liegen die Werte für B 35 im Mittel sogar geringfügig über denen von E 36, d.h. eine positive Korrelation von sinkender Photosynthese und abnehmendem interzellulärem CO₂-Gehalt besteht nicht. Ähnliche Ergebnisse erhielten auch PREMACHANDRA et al. (1994) bei Freilandexperimenten an den beiden *Sorghum*-Kultivaren B 35 und TX 7078. Unter Bewässerung lagen die mittleren interzellulären CO₂-Gehalte bei ca. 175 ppm, unter Trockenstreß sank der Wert in der trockentoleranten Sorte TX 7078 auf 96 ppm, in der sensitiven Sorte B 35 stieg er auf 197 ppm an. Diese Daten lassen also die Vermutung zu, daß unter den in dieser Arbeit verwendeten Versuchsbedingungen, auch andere Faktoren die Photosyntheserate unter Trockenstreß beeinflussen. Diese nicht-stomatären Faktoren können z.B. durch abnehmende Enzymaktivität verursacht werden, welche dann limitierend für die Photosynthese werden (DU et al., 1998).

Weitere Indizien für diese Vermutung ergaben die Photosynthesemessungen unter vermindertem CO₂-Gehalt des Meßgases. Vergleicht man die Reaktion von Kontrollpflanzen und trockengestreßten Pflanzen auf geringer werdende CO₂-Gehalte der umgebenden Atmosphäre (siehe Abb. 3.20) erkennt man typische Substratsättigungskurven. Auffällig dabei ist der Unterschied der Steigung bei niedrigem CO₂-Gehalt, der bei den gestreßten Pflanzen deutlich flacher verläuft als bei den Kontrollpflanzen. Daß dieser Effekt nicht auf eine schlechtere CO₂-Versorgung durch schließende Stomata zurückzuführen ist, zeigt die Auftragung der Photosyntheserate gegen die interzelluläre CO₂-Konzentration (siehe Abb. 3.23). Der flachere Verlauf der Kurve impliziert eine geringere Aktivität des CO₂-fixierenden Enzyms, der PEPCase. Dieses Ergebnis überrascht jedoch angesichts der unveränderten maximalen PEPCase-Aktivität in Kontrollpflanzen und gestreßten Pflanzen, die unter limitierenden CO₂-Konzentrationen einen identischen Kurvenverlauf

erwarten ließen, wie er von MASSACCI et al. (1996) beschrieben wird. Ein direkter Vergleich der von MASSACCI et al. (1996) publizierten Daten mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist jedoch problematisch, da sich die Rahmenbedingungen der beiden Experimente voneinander unterscheiden. Zum einen erfolgten die Messungen an Pflanzen unterschiedlicher Entwicklungsstadien, zum anderen erfolgte die Initiierung des Trockenstresses unterschiedlich schnell, wodurch die Pflanzen möglicherweise Gelegenheit hatten sich physiologisch an den Trockenstreß anzupassen. Die Unterschiede werden deutlich, wenn man die Blattdruckpotentiale der Versuchspflanzen gegenüberstellt: die Kontrollpflanzen dieser Arbeit wiesen ein Blattdruckpotential von $-2 \pm 0,5$ bar auf, in den gestreßten Pflanzen sanken die Blattdruckpotentiale auf -12 bis -20 bar. Im Vergleich dazu besaßen die von MASSACCI et al. (1996) verwendeten Kontrollpflanzen Blattdruckpotentiale von -12 ± 2 bar, welche in den gestreßten Pflanzen auf -19 ± 2 bar sanken. Damit lag der Unterschied der Blattdruckpotentiale zwischen Kontrollpflanzen und gestreßten Pflanzen deutlich niedriger als im Rahmen dieser Arbeit, wodurch die unterschiedlichen Reaktionen auf geringe CO_2 -Konzentrationen möglicherweise erklärt werden.

Betrachtet man die Reaktion der Stomata auf das sinkende CO_2 -Angebot (siehe Abb. 3.22), erkennt man, daß die stomatäre Leitfähigkeit mit abnehmendem CO_2 -Gehalt steigt. Dieser Effekt ist um so stärker ausgeprägt, je besser die Pflanzen mit Wasser versorgt sind. Die stomatäre Leitfähigkeit der Kontrollpflanzen bei 400 ppm CO_2 liegt im Mittel bei etwa $0,8 \text{ s cm}^{-1}$ und steigt bei 50 ppm CO_2 um etwa 65% auf $1,3 \text{ s cm}^{-1}$. Selbst unter optimaler Wasserversorgung kommt es also unter physiologischen CO_2 -Gehalten der Atmosphäre nicht zu einer maximalen Spaltöffnung. Die trockengestreßten Pflanzen zeigen diesen Effekt in Abhängigkeit ihres Blattdruckpotentials und der jeweiligen Sorte differenzierter. Die stark trockengestreßte Pflanzen reagieren nicht mehr mit Öffnen der Stomata auf die sinkende CO_2 -Versorgung. Trotz der unterschiedlichen Reaktionen von Kontrollpflanzen und gestreßten Pflanzen ist das Verhältnis des CO_2 -Gehaltes der Atmosphäre zum interzellulären CO_2 -Gehalt in allen untersuchten Pflanzen, insbesondere unter niedriger CO_2 -Versorgung ($< 250 \text{ ppm}$) gleich. Unter höherem atmosphärischen CO_2 -Gehalt ($> 250 \text{ ppm}$) steigt der interzelluläre CO_2 -Gehalt in den Kontrollpflanzen geringfügig stärker an als in den gestreßten Pflanzen. Im Zusammenhang zeigen die Ergebnisse der Gaswechselfmessungen unter vermindertem CO_2 -Gehalt des Meßgases, daß die stomatäre Leitfähigkeit unter den gewählten Versuchsbedingungen von zwei Regelkreisen bestimmt wird. Der dominierende Faktor ist dabei das Wasser; extrem trockengestreßte Pflanzen öffnen die Stomata auch unter niedrigem interzellulärem CO_2 -Gehalt nicht weiter. Demgegenüber zeigen selbst unter optimaler Wasserversorgung die Pflanzen unter physiologischen CO_2 -Gehalten des Meßgases nicht die maximale stomatäre Leitfähigkeit. Aus der Korrelation von sinkender Photosynthese und herabgesetzter stomatärer Leitfähigkeit läßt sich also per se noch keine Kausalität ableiten, da sich Photosynthese und stomatäre Leitfähigkeit gegenseitig beeinflussen. Zur Klärung der Frage ob die Photosynthese durch herabgesetzte stomatäre Leitfähigkeit limitiert wird, müssen weitere Faktoren wie z.B. interzellulärer CO_2 -Gehalt oder Messungen unter veränderten CO_2 -Versorgung der Pflanzen, berücksichtigt werden.

4.3.3 Chlorophyllfluoreszenz

Die Verwendung von Chlorophyllfluoreszenz-Messungen des Photosystems II an C₄-Pflanzen birgt aufgrund des besonderen Aufbaus der C₄-Blätter einige Besonderheiten, auf die zu Beginn der Diskussion über die Fluoreszenzdaten kurz hingewiesen werden soll. Die Blätter vieler C₄-Pflanzen zeigen mit dem Besitz von Mesophyll- und Bündelscheidenzellen eine völlig andere Anatomie als die Blätter von C₃-Pflanzen. Mit der räumlichen Trennung von primärer CO₂-Fixierung in den Mesophyllzellen und der endgültigen Fixierung durch den Calvin-Zyklus in den Bündelscheidenzellen ist ein unterschiedlicher Bau der Chloroplasten in beiden Zelltypen verknüpft. Während die Chloroplasten der Mesophyllzellen weitestgehend denen aus C₃-Pflanzen entsprechen, besitzen die Chloroplasten der Bündelscheidenzellen keinen bzw. nur einen sehr reduzierten Anteil von PS II und Wasserspaltungsapparat. Diese Modifikation erlaubt es den C₄-Pflanzen, den O₂-Partialdruck in den Bündelscheidenzellen auf einem niedrigen Niveau zu halten, wodurch, neben den erhöhten CO₂-Konzentrationen, die Photorespiration unterdrückt wird. Durch den geringen Anteil von Photosystem II in den Bündelscheidenzellen beziehen sich jedoch die durch die Chlorophyllfluoreszenz-Messungen ermittelten Daten, nur auf die Mesophyllzellen. Durch biochemische Prozesse und Transportvorgänge des vorgeschalteten C₄-Stoffwechselweges zwischen Mesophyllzellen und endgültiger Carboxylierung im Calvin-Zyklus ergeben sich weitere Aspekte, welche die Fluoreszenzdaten mitbestimmen.

F_v/F_m-Verhältnis

Das F_v/F_m-Verhältnis beschreibt nach POWLES (1984) den aktuellen Grad der Photoinhibierung, der durch sinkende Photosynthese bei steigendem Quantenbedarf charakterisiert wird (GENTY et al., 1990; KRAUSE und WEIS, 1991). Viele Pflanzenarten zeigen in ungestreßtem Zustand F_v/F_m-Quotienten zwischen 0,75 und 0,83 (BJÖRKMANN und DEMMIG, 1987). Unter Streß wie z.B. Starklicht, Hitze, Kälte oder Trockenheit, kann das F_v/F_m-Verhältnis stark absinken, wobei es sich um einen, je nach Grad des Stresses, reversiblen Vorgang handelt (COUSINS et al., 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das F_v/F_m-Verhältnis in drei unterschiedlichen Experimenten bestimmt. In einem ersten Versuch erfolgten Messungen an allen Blättern von Kontrollpflanzen und gestreßten Pflanzen unter Anzuchtbedingungen in der Klimakammer (siehe Abb. 3.8). Dabei zeigen alle Blätter beider Kultivare unter Kontrollbedingungen F_v/F_m-Quotienten zwischen 0,71 und 0,8. Diese hohen Werte deuten auf vernachlässigbare Photoinhibierung unter den gewählten Anzuchtbedingungen hin. Unter Trockenstreß sinkt das F_v/F_m-Verhältnis in allen Blättern ab, wobei dieser Effekt in den älteren Blättern stärker auftritt als in den jüngeren Blättern.

In einem weiteren Versuch unter den gleichen Bedingungen wurden weitere Messungen am zweiten Blatt durchgeführt. Die F_v/F_m-Quotienten der Kontrollpflanzen lagen dabei wiederum auf sehr hohem Niveau. Bei den gestreßten Pflanzen sank das F_v/F_m-Verhältnis der Sorte E 36 im Vergleich zu B 35 bei vergleichbaren Streßpotentialen etwas stärker ab, zeige aber mit Werten zwischen 0,6 und 0,7 keine übermäßig starke Photoinhibierung. Im dritten Experiment erfolgte die Fluoreszenzmessung unter

erhöhtem CO₂-Gehalt der Meßgases. Dabei hatten die Kontrollpflanzen gleich hohe F_v/F_m -Verhältnisse wie bei den vorhergehenden Versuchen, die Werte der gestreßten Pflanzen lagen geringfügig höher als bei den Messungen unter Anzuchtbedingungen und waren nur wenig photoinhibiert. Diese Ergebnisse korrelieren sehr gut mit den von COUSINS et al. (2002) publizierten Daten. In deren Versuchen wurden trockengestreßte *Sorghum*-Pflanzen unter erhöhtem CO₂-Gehalt der Atmosphäre kultiviert, dabei zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede des F_v/F_m -Quotienten zwischen den Kontrollpflanzen und trockengestreßten Pflanzen. Unter den gewählten Lichtintensitäten der Pflanzenanzucht in diesem Versuch kommt es in den Kontrollpflanzen nicht zu negativen Effekten auf das F_v/F_m -Verhältnis. Bei den gestreßten Pflanzen kommt es durch die Kombination von Trockenstreß und Licht nur zu einer relativ geringen Photoinhibition, wie sie auch von JAGTAP et al. (1998) für die Sorte E 36 beschrieben wurde. In Kombination von Trockenstreß und starker Beleuchtung ($2500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sinkt das F_v/F_m -Verhältnis in *Sorghum*-Kultivaren jedoch deutlich stärker auf Werte von 0,36 - 0,5 ab (MASOJIDEK et al., 1991). Ähnliche Werte publizierten SACCARDY et al. (1998) für Mais, bei dem Trockenstreß und hohe Lichtintensitäten die Effekte auf das F_v/F_m -Verhältnis gegenseitig verstärkten.

Photochemische Fluoreszenzlöschung (q_p)

Die photochemische Fluoreszenzlöschung beschreibt den Reduktionsgrad der photosynthetischen Elektronentransportkette. Hohe Werte von q_p symbolisieren einen geringen Reduktionsgrad, woraus auf einen hohen NADPH Verbrauch im C₄-, bzw. Calvin-Zyklus geschlossen werden kann. Verlangsamt sich der Verbrauch, kommt es zu einer Akkumulation von Redoxäquivalenten, wodurch der Wert der photochemischen Löschung sinkt. Der höhere Reduktionsgrad der Elektronentransportkette bewirkt einen Anstieg des ΔpH über der Tylakoidmembran, was zu einem höheren nicht-photochemischen Löschungskoeffizienten (q_n) führt.

Wie auch beim F_v/F_m -Verhältnis, besteht bei den Kontrollpflanzen kein Unterschied für q_p zwischen den beiden Kultivaren. Aufgrund der engen Beziehung zwischen photochemischem Löschungskoeffizienten und Photosyntheserate sinken die Werte für q_p in den trockengestreßten Pflanzen stark ab, wie dies auch von LORETO et al. (1995) beschrieben wurde. Dabei korrelieren die höheren Photosyntheseraten der Sorte E 36 mit höheren Werten für q_p in den gestreßten Pflanzen (siehe Abb.3.32). Um stomatäre Effekte auf die photochemische Löschung auszuschließen, wurden die Messungen in einem zweiten Versuch unter erhöhtem CO₂- (5%) und herabgesetztem O₂-Gehalt (2%) des Meßgases durchgeführt (siehe Abb. 3.26). Durch diese Gaskonzentrationen sollte der interzelluläre CO₂-Gehalt selbst bei geschlossenen Stomata so hoch sein, daß CO₂-Mangel für die beobachteten Effekte auszuschließen war. Vergleicht man die Ergebnisse beider Versuche miteinander, findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Verhalten der beiden *Sorghum*-Kultivare. Auch unter erhöhter CO₂-Konzentration ist die photochemische Löschung der gestreßten E 36 Pflanzen deutlich größer als die der Sorte B 35. Diese Werte deuten wie schon die Ergebnisse der Gaswechselfmessungen darauf hin, daß stomatäre Effekte unter den gewählten Bedingungen nicht der Grund für die unterschiedlichen Photosyntheseraten unter Streß sind. Im Gegensatz dazu zeigten die von COUSINS et al. (2002) mit zusätzlichem CO₂ begasten *Sorghum*-

Pflanzen unter Trockenstreß höhere photochemische Löschung als die gestreßten Pflanzen unter normaler Atmosphäre, jedoch lassen sich die Ergebnisse aufgrund der Unterschiede (Freilandversuch, höheres Pflanzenalter) nicht direkt miteinander vergleichen.

Die Quantenausbeute des PS II ($\Phi_{PS II}$) ist das Produkt aus der Anzahl der offenen Reaktionszentren und der Quantenausbeute der offenen Reaktionszentren (GENTY et al., 1989). Bedingt durch die geringere photochemische Löschung sinkt daher auch die Quantenausbeute unter Streß ab (LORETO et al., 1995). Aufgrund des höheren photochemischen Lösungskoeffizienten der Sorte E 36 unter Streß liegt die auch die Quantenausbeute der trockengestreßten E 36 Pflanzen sowohl unter Anzuchtbedingungen, als auch unter erhöhtem CO₂-Gehalt über der von B 35 (siehe Abb. 3.27, 3.33). Insgesamt liegt die Quantenausbeute der trockengestreßten Pflanzen bei höherem CO₂-Gehalt des Meßgases etwas höher als bei normaler CO₂-Versorgung, was sich mit den Beobachtungen der Freilandversuche von COUSINS et al. (2002) deckt.

Nicht-photochemischer Lösungskoeffizient, q_n

Der Anstieg des Protonengradienten über der Thylakoidmembran bei sinkender photochemischer Löschung q_p führt zu einer Zunahme des nicht-photochemischen Lösungskoeffizienten q_n . Dieser besteht aus verschiedenen Komponenten, welche sich z.T. durch die zeitliche Trennung ihrer Relaxation voneinander unterscheiden lassen (KRAUSE und WEIS, 1991). Die schnellste Relaxation ($t_{1/2} < 1\text{min}$) erfolgt dabei durch die energieabhängige Löschung (q_e), die zweite Phase ($t_{1/2} < 8\text{min}$) durch die state-transition-abhängige Löschung (q_t) und eine langsam relaxierende Phase ($t_{1/2} \approx 40\text{min}$) welche durch die photoinhibitorische Löschung (q_i) verursacht wird. Da eine vollständige Trennung der einzelnen Komponenten nicht immer möglich ist (LEE et al., 1990; SOMERSALO und KRAUSE, 1990) lassen sich die schnellen und mittelschnellen Komponenten q_e und q_t zu einem Koeffizienten q_f zusammenfassen (GENTY et al., 1990; WALTERS und HORTON, 1991; BRÜGGEMANN, 1992). Dabei wird q_f unter gemäßigten Temperaturen und Lichtintensitäten vornehmlich durch q_e geprägt, welches einen Schutz vor Photoinhibierung bewirkt (THIELE und KRAUSE, 1994; HORTON et al., 1994).

Sowohl unter normalem CO₂-Gehalt des Meßgases, als auch unter erhöhtem CO₂-Gehalt kommt es in beiden Kultivaren zu einem Anstieg der nicht-photochemischen Löschung unter Trockenstreß (siehe Abb.3.28; 3.34). Im Gegensatz zum photochemischen Lösungskoeffizienten läßt sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kultivaren erkennen. Um herauszufinden, welche Faktoren q_n prägen, wurden die einzelnen Lösungskoeffizienten einer Korrelationsanalyse unterzogen, wobei eine stark positive Korrelation zwischen q_n und q_f zu beobachten war (siehe Tab. 3.2)

Ein etwas anderes Bild ergibt sich bei den Fluoreszenzmessungen, die unter normalen CO₂-Gehalten des Meßgases durchgeführt wurden. Im Gegensatz zu den Messungen unter erhöhter CO₂-Versorgung steigen die Werte der nicht-photochemischen Löschung in beiden Sorten unter Streß stärker an. Wie zuvor ist q_n hauptsächlich durch q_f geprägt, jedoch zeigen die gestreßten Pflanzen deutlich höhere Photoinhibition als bei den Messungen unter erhöhtem CO₂-Gehalt. Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, daß die

Kapazität der energieabhängigen Löschung unter normalem CO₂-Versorgung schneller ausgeschöpft ist, wodurch q_n dann zunehmend durch q_i determiniert wird (HORTON et al., 1988; ÖQUIST et al., 1992).

Möglicherweise lassen sich die durch den Trockenstreß ausgelösten Effekte durch höhere CO₂-Konzentrationen teilweise kompensieren bzw. abschwächen (WALL et al., 2001; COUSINS et al., 2002). Gegen diese Annahme sprechen jedoch die Werte der photochemischen Löschung, die durch die veränderten CO₂-Konzentrationen unbeeinflusst blieben. Da das in diesem Versuch verwendete Meßgas nicht nur einen höheren CO₂-Gehalt, sondern auch einen 10fach geringeren O₂-Partialdruck aufwies als normale Luft, könnten die Unterschiede beider Meßreihen eventuell auch durch geringere Raten der Mehler-Peroxidase Reaktion (FOYER et al., 1994) zurückzuführen sein, wie sie von LAISK und EDWARDS (1998) für *Sorghum* unter verringerter O₂-Atmosphäre beschrieben wurden. Dadurch würde der Anteil reaktiver Sauerstoffspezies vermindert, die auch am D1-Protein des PS II angreifen und Photoinhibition verursachen können (ARO et al., 1993).

4.3.4 Pigmente

Durch den Trockenstreß kam es nicht nur zu einer Veränderung der Chlorophyllfluoreszenz, sondern auch zu Veränderungen der Pigmentzusammensetzung in den untersuchten Pflanzen. Dabei soll zunächst auf die Chlorophylle eingegangen werden.

Höhere Pflanzen besitzen zwei unterschiedliche Chlorophylle (a,b), die zu unterschiedlichen Teilen Bestandteil der Lichtsammelkomplexe und photosynthetischen Reaktionszentren sind. Im Photosystem I (CP I Komplex) liegt das Chl. a/b-Verhältnis bei ca. 20, d.h. der Chlorophyll b Anteil beträgt nur etwa 5%. Etwas größer ist der Anteil im Photosystem II mit einem Chl. a/b-Verhältnis von 5. Den größten Anteil von Chl. b findet man in den Lichtsammelkomplexen, in denen das Chl. a/b-Verhältnis 1,1-1,3 beträgt (LAWLOR, 1990). In Pigmentextrakten von C₃-Pflanzen findet man in der Regel Chl. a/b-Verhältnisse von etwa 3 vor (BARTH et al., 2001), in C₄-Pflanzen liegt das Verhältnis mit Werten von 3,6- 5,3 z.T. deutlich höher (BADIANI et al., 1997; SACCARDY et al., 1998).

Die blattflächenbezogene Chlorophyllmenge ist abhängig von unterschiedlichen Faktoren, wie z.B. der Art, Blattalter, Lichtintensität oder der Stickstoffversorgung. Dabei kann unter bestimmten Voraussetzungen der Chlorophyllgehalt des Blattes zum limitierenden Faktor der Photosynthese werden (ALBERDA, 1969).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit trockengestreßten *Sorghum*-Pflanzen läßt sich ein Chlorophyllabbau beobachten, der mit der Streßintensität bzw. mit dem sinkenden Blattdruckpotential korreliert, wie dies auch von anderen Arbeitsgruppen für Mais, Zuckerrohr und *Sorghum* beschrieben wurde (COUSINS et al., 2002; DU et al., 1996; JAGTAP et al., 1998; SACCARDY et al., 1998; ZHANG und KIKHAM, 1996). Dabei erkennt man einen deutlichen Unterschied zwischen jüngeren und älteren Blättern. Je älter die Blätter sind, desto größer ist der durch den Trockenstreß verursachte Chlorophyllverlust. Im Gegensatz dazu bleibt der Chlorophyllgehalt der jüngsten Blätter während des

Stresses konstant. Entweder kommt es in den jüngsten Blättern nicht zu einem Abbau des Chlorophylls, oder es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Abbau und Neusynthese ein, durch den der Chlorophyllgehalt konstant bleibt. Eine Limitierung der Photosynthese durch den sinkenden Chlorophyllgehalt ist unter diesen Versuchsbedingungen nicht wahrscheinlich. Die Chlorophyllgehalte der am stärksten geschädigten Blätter entsprechen ungefähr denen junger Kontrollblätter (siehe Abb. 3.12). Bei gleichem Chlorophyllgehalt realisieren die jungen Blätter jedoch deutlich höhere (1-4fach) Photosyntheseraten, so daß man davon ausgehen kann, daß der Chlorophyllgehalt der trockengestreßten Pflanzen die Photosynthese nicht limitiert.

Neben der Abnahme des Gesamtchlorophyllgehaltes verändert sich auch die Pigmentzusammensetzung der Blätter unter Trockenstreß. Betrachtet man das Chl. a/b-Verhältnis, erkennt man eine Abnahme von den jungen zu den alten Blättern, generell liegt der Anteil von Chl. a in der Sorte B 35 etwas über dem von E 36. Unter Trockenstreß sinkt das Chl. a/b-Verhältnis in allen Blättern, was nicht nur bei C₄-Pflanzen wie Mais (SACCARDY et al., 1998), sondern auch in C₃-Pflanzen wie *Helianthus* (QARTACCI und NAVARI-IZZO, 1991) beobachtet werden kann. Ähnliche Effekte traten bei *Sorghum*-Kultivaren auf, die zeitweise niedrigen Temperaturen ausgesetzt wurden (BALDIANI et al., 1997). Untersuchungen von MASOJIDEK et al. (1991) an isolierten Thylakoidmembranen von *Sorghum bicolor* und *Pennisetum glaucum* zeigten eine veränderte Verteilung von Chlorophyll in den Photosystemen, nachdem die Pflanzen Trockenstreß ausgesetzt waren. Dabei nahm der relative Anteil des PS I Core-Komplexes zu, wohingegen insbesondere der Anteil des PS II Core-Komplexes zurückging.

Durch die Abnahme des Chlorophyllgehaltes stieg, bei gleichbleibendem Carotinoidgehalt auch das Car./Chl.(a,b)-Verhältnis unter Trockenstreß an, was auch von anderen Arbeitsgruppen bei Mais und *Sorghum* beobachtet wurde (SACCARDY et al., 1998; MASOJIDEK et al., 1991). Wie schon bei den Chlorophyllgehalten des jüngsten Blattes kann dabei aus den vorliegenden Daten nicht geschlossen werden, ob die Carotinoide durch den Trockenstreß unverändert bleiben oder ob sich Synthese und Abbau ausgleichen. Das höhere Carotinoidverhältnis unter Trockenstreß könnte eine Schutzfunktion für die Zelle beinhalten, da die Carotinoide nicht nur als akzessorische Pigmente der Lichtsammelkomplexe fungieren, sondern auch protektive und regulatorische Funktionen einnehmen (COGDELL, 1988; RAU, 1988). Insbesondere sollten Effekte des Xanthophyllzyklus untersucht werden, durch den überschüssige Energie der Elektronentransportketten als unschädliche Wärme abgegeben wird, was durch die Chlorophyllfluoreszenz als q_f gemessen werden kann. Dieser Mechanismus wird aktiviert, wenn der photochemische Energieumsatz (q_p) unter bestimmten Streßsituationen sinkt. Aus diesem Grund wurden Pigmentextrakte unterschiedlich behandelter Pflanzen mittels HPLC getrennt und analysiert (JAHNS und KRAUSE, 1994). Unter Trockenstreß kommt es in den untersuchten *Sorghum*-Kultivaren nur zu einer geringfügigen Zunahme der Xanthophyllzykluspigmente, was auch von anderen Arbeitsgruppen festgestellt wurde (COUSINS et al., 2002; SACCARDY et al., 1998). Ein Unterschied zwischen beiden Sorten in der Größe der Pigment-Pools besteht jedoch nicht. Der Deepoxidationsstatus stieg in den Kontrollpflanzen beider Sorten nach Belichtung auf etwa 55% an. Berücksichtigt man, daß unter extremen Lichtbedingungen bis zu etwa 2/3 des Violaxanthins deepoxidiert werden können

(ARVIDSON, 1996), bedeutet dies, daß die Kapazität der Energiedissipation durch Wärmeabstrahlung in den Kontrollpflanzen nicht voll ausgenutzt wurde. Im Vergleich dazu stieg der Deepoxidationsstatus der gestreßten Pflanzen deutlich schneller an und erreichte höhere Werte als in den Kontrollpflanzen. Dabei lag der Deepoxidationsgrad der Sorte E 36 etwas höher als der von B 35. Unter den gewählten Lichtintensitäten, führt Trockenstreß also zu einem höheren Deepoxidationsstatus des Xanthophyllzyklus. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch die Untersuchungen an Mais von SACCARDY et al. (1998) und COUSINS et al. (2002) an trockengestreßten *Sorghum*. Interessanterweise zeigten in die von COUSINS et al. (2002) verwendeten trockengestreßten *Sorghum*-Pflanzen mit höherer CO₂-Versorgung auch einen höheren Deepoxidationsstatus als die Pflanzen, die unter normalem CO₂-Gehalt kultiviert wurden. Zu erwarten wäre eigentlich ein niedrigerer Deepoxidationsgrad, da durch das zusätzliche CO₂ die Photosyntheseraten gesteigert wurden.

Obwohl die nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung in vielen Untersuchungen sehr stark mit dem Deepoxidationsstatus korreliert (BRÜGGEMANN und KOROLEVA, 1995; KOROLEVA et al., 1994; DEMMIG-ADAMS, 1990), scheinen die höheren Werte für q_f in den gestreßten Pflanzen nicht durch den Deepoxidationsgrad bestimmt zu werden. Vergleicht man den Deepoxidationsstatus von Kontrollpflanzen und gestreßten Pflanzen nach 15 minütiger Belichtung, betrugen die Unterschiede des Deepoxidationsstatus nur 10 - 20%. Im Gegensatz dazu stieg der Wert der nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung q_n bzw. der schnell relaxierenden Komponente q_f in den gestreßten Pflanzen nahezu um das Doppelte an. Diese nicht proportionalen Zunahmen weisen darauf hin, daß q_f unter den gewählten Bedingungen durch einen anderen Faktor dominiert wird. Auch bei den Untersuchungen von COUSINS et al. (2002) an trockengestreßten *Sorghum*-Pflanzen ergab sich keine eindeutige Korrelation zwischen dem Deepoxidationsstatus und der nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung. Arbeiten von NIYOGI (2000) an konstitutiv Zeaxanthin produzierenden *Arabidopsis*-Mutanten zeigten, daß zusätzlich ein pH-Gradient aufgebaut werden muß um die nicht-photochemische Löschung zu steigern. Andererseits können auch Pflanzen mit niedrigem Zea- und Antheraxanthingehalt eine hohe nicht-photochemische Löschung aufweisen (GILMORE, 1997), die dann durch die energieabhängige Löschung q_e geprägt wird. Ähnlich wie bei den Untersuchungen von SACCARDY (1998) an Mais zeigten die trockengestreßten *Sorghum*-Kultivare auch nach langer Dunkelphase signifikant höhere Gehalte von Zea- und Antheraxanthin. Ob dieser höhere Deepoxidationsgrad der trockengestreßten Pflanzen ein geringeres F_v/F_m -Verhältnis verursacht, wie von DEMMIG-ADAMS und ADAMS (1992) und ADAMS et al. (1994) vermutet, ist bislang ungeklärt. Konstitutiv erhöhte Zea- und Antheraxanthingehalte sollen nach THIELE et al. (1996) das D1-Protein im Photosystem II vor Inaktivierung schützen.

Generell lassen sich Beziehungen zwischen den Xanthophyllkonzentrationen aus Blattextrakten und Chlorophyllfluoreszenzdaten des PS II nur schwer herstellen, da ein großer Teil der Xanthophylle mit dem PS I assoziiert sind oder frei in der Tylakoidmembran vorliegen (THAYER und BJÖRKMANN, 1992; HAVAUX und GRUSZECKI, 1993). Insbesondere gilt dies für C₄-Pflanzen, die aufgrund des Chloroplastendimorphismus fast keine Granathylakoide und PS II in den Bündelscheidenzellen besitzen (PFÜNDEL et al., 1996).

4.3.4 Enzymaktivitäten

Die Ergebnisse der Gaswechsellmessungen weisen darauf hin, daß die Photosyntheseleistung der trockengestreßten Pflanzen unter den gewählten Bedingungen nicht allein durch stomatäre Effekte bestimmt wird, sondern daß darüber hinaus nicht-stomatäre Effekte wirken. Aufgrund der Komplexität des C₄-Stoffwechsels ist es jedoch schwierig, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Photosynthese unter verschiedenen Umweltbedingungen zu bestimmen. In C₃-Pflanzen können die relativen Poolgrößen für einzelne Metabolite und Enzymaktivitäten der Schlüsselenzyme leicht bestimmt werden, und verschiedene molekularbiologische Ansätze mit reduzierten Enzymaktivitäten haben zur Aufklärung der Regulation beigetragen (Übersicht: FURBANK und TAYLOR, 1995). Die experimentellen Daten weisen darauf hin, daß insbesondere unter Starklicht und normaler CO₂-Versorgung in den meisten Fällen die Rubisco-Aktivität den limitierenden Faktor der Photosynthese in C₃-Pflanzen darstellt. Im Gegensatz dazu ist die Substratversorgung der Rubisco in C₄-Pflanzen nicht direkt abhängig von der CO₂-Konzentration im Interzellularraum und die Konzentrationen von Metaboliten und Regulatoren innerhalb der Bündelscheidenchloroplasten sind, nicht zuletzt aufgrund der experimentellen Schwierigkeiten, bislang nur wenig untersucht. Zur Bestimmung, welche Enzyme für die Photosynthese in C₄-Pflanzen limitierend sein könnten wurde die Aktivität der extrahierten Enzyme mit der Photosyntheserate unter verschiedenen äußeren Bedingungen oder anderen Arten miteinander verglichen. Dabei zeigten sich hohe positive Korrelationen zwischen der Photosyntheserate und der Aktivität verschiedener Enzyme des C₃- und C₄-Zyklus, wie z.B. PPKK, PEPCase, NADP-MDH, NADP-ME, NAD-ME und Rubisco (FURBANK et al., 1997; DU et al., 1996). Trotz der hohen Korrelationen ließen die Ergebnisse keinen sicheren Schluß zu, ob die untersuchten Enzyme in vivo tatsächlich limitierend würden, da viele andere Parameter die gemessenen Enzymaktivitäten mit beeinflussen können. Einen anderen experimentellen Ansatz verfolgen antisense-RNA Pflanzen der dikotylen C₄-Art *Flaveria bidentis* (CHITTY et al., 1994) und *Amaranthus edulis* (MAROCO et al., 1998). Durch diese gentechnische Methode ist es möglich, die Aktivität einzelner Enzyme in vivo herabzusetzen und die resultierenden Effekte auf die Photosynthese zu beobachten. Dabei weisen die Versuchsergebnisse an C₄-Pflanzen mit verringertem Gehalt von Rubisco (FURBANK et al., 1996), PPKK (FURBANK et al., 1997) und MDH (TREVANION et al., 1997) darauf hin, daß unter hohen Lichtintensitäten und normalem CO₂-Gehalt der Atmosphäre, Rubisco und PPKK die Photosynthese kontrollieren. Aufgrund der Unterschiede zwischen den verschiedenen C₄-Arten, lassen sich allerdings die an der dikotylen Gattung *Flaveria* gewonnenen Ergebnisse nicht ungeprüft auf andere C₄-Spezies verallgemeinern, die sich hinsichtlich ihrer Stoffwechselwege voneinander unterscheiden. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit sechs Enzyme des C₃- und C₄-Zyklus hinsichtlich ihrer möglichen Rolle als limitierender Faktor der Photosynthese untersucht und sollen im Folgenden diskutiert werden.

PEPCase

PEPCase katalysiert die primäre Fixierung von Kohlenstoff in den Mesophyllzellen der C₄-Pflanzen. Im Gegensatz zur Rubisco dient dabei nicht gelöstes CO₂ als Substrat, sondern HCO₃⁻ welches im Gleichgewicht mit dem CO₂ des Interzellularraums steht. Dabei entsteht als erstes Produkt die C₄-Dicarbonsäure Oxalacetat. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten maximalen Aktivitäten der PEPCase in den beiden *Sorghum*-Kultivaren E 36 und B 35 liegen sowohl in den Kontrollpflanzen, wie auch in den trockengestreßten Pflanzen weit über den jeweiligen Photosyntheseraten und scheinen diese nicht zu limitieren, was auch durch die Ergebnisse anderer Arbeiten an *Sorghum* (CONTOUR-ANSEL et al., 1996) und Zuckerrohr (DU et al., 1996) bestätigt wurde. Ein Rückgang der PEPCase-Aktivität bei Trockenstreß, wie er von einigen Autoren für beschrieben wurde (CONTOUR-ANSEL et al., 1996; DU et al., 1996; JAGTAP et al., 1998; WATLING et al., 2000), konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Dies ist möglicherweise auf die kürzere Streßperiode zurückzuführen, durch die längerfristige Folgeeffekte des Trockenstresses, wie z.B. Enzymabbau im Fall der PEPCase, nicht zu beobachten waren.

Vergleicht man die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen mit den Ergebnisse aus den Gaswechselfmessungen, stößt man auf zwei unterschiedliche Ergebnisse. Die Gaswechselfmessungen unter vermindertem CO₂-Gehalt (siehe Abb. 3.20) zeigten unterschiedliche Kurven für gestreßte Pflanzen und Kontrollpflanzen. Aufgrund der identischen interzellularen CO₂-Gehalte (siehe Abb. 3.22 und 3.23) weisen die unterschiedlichen Fixierungsraten für CO₂ auf eine limitierte PEPCase-Aktivität in den gestreßten Pflanzen hin. Im Gegensatz dazu konnte jedoch bei der Bestimmung der maximalen Umsatzraten der PEPCase kein Unterschied zwischen den trockengestreßten Pflanzen und den Kontrollpflanzen beobachtet werden. Aus diesem Grund erfolgten weitere Untersuchungen an der PEPCase. Die nach DU et al. (1996) durchgeführten PEPCase-Messungen erfolgten bei einem pH-Wert von 7,8, der sehr nahe am pH-Optimum der PEPCase liegt (siehe Abb. 3.38). Bereits geringe Veränderungen des pH-Wertes in den sauren bzw. neutralen Bereich bewirken jedoch einen drastischen Aktivitätsverlust. Bei einem postulierten pH-Wert für das Cytosol von C₄-Pflanzen (YIN et al., 1993) beträgt die Aktivität der PEPCase nur noch etwa 50% der gemessenen maximalen Aktivität. Darüber hinaus könnte das sinkende osmotische Potential in den trockengestreßten Zellen zusätzlich zu einer Ansäuerung führen, wie dies für Spinatprotoplasten und *Clamydomonas* beschrieben wurde (BERKOWITZ und GIBBS, 1983 a,b; BERKOWITZ et al., 1983). Die pH-Änderungen im Bereich von 0,2 - 0,4 pH-Einheiten hätten ein weiteres Sinken der PEPCase-Aktivität zur Folge, wodurch in vivo unter Trockenstreß nur ein geringer Teil der maximalen Enzymaktivität zur Verfügung stünde. Eine genaue Bestimmung des cytosolischen pH-Werts von trockengestreßten *Sorghum*-Blättern ist jedoch auf Grund der Meßmethode nicht möglich, da dem Blatt die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe in wässriger Lösung durch die Petiole zugeführt werden müssen.

Neben der Regulation durch den pH-Wert des Reaktionsmediums wird die Aktivität der PEPCase durch eine Vielzahl unterschiedlicher Effektoren beeinflusst und reguliert (DONCASTER und LEEGOOD, 1987). Eine Übersicht der wichtigsten Effektoren ist in Tab. 4.1 dargestellt:

Effektor	V _{max} in % der Kontrolle (0,5 mM PEP)
3mM Glukose-6-P	417
2mM Fruktose-6-P	283
5mM Triosephosphat	299
3mM 3-Phosphoglycerat	85
5mM Phosphat	59
5mM Serin	370
10mM Glycin	314
5mM Alanin	206
5mM Prolin	159
2mM Malat	34
20mM Glutamat	10
5mM Aspartat	10

Tab. 4.1: Effektoren der PEPCase (nach DONCASTER und LEEGOOD, 1987)

Durch Experimente mit radioaktiv markiertem CO₂ an PEPCase aus *Streptomyces* C5 wurde darüber hinaus Oxalacetat als starker Inhibitor identifiziert, durch den eine etwa dreifach stärkere Inhibierung erfolgt als durch Malat (DEKLEVA und STROHL, 1988).

Viele der in Tab. 4.1 aufgeführten Effektoren liegen in den Blättern der C₄-Pflanzen als Metabolite des C₃- und C₄-Zyklus z.T. in erheblichen Konzentrationen vor und können somit Einfluß auf die PEPCase-Aktivität in vivo nehmen (LEEGOOD, 2000, 1985; LEEGOOD und FURBANK, 1984; LEEGOOD und v. CAEMMERER, 1989; USUDA, 1987; WEINER und HELDT, 1992; STITT und HELDT, 1984). Tabelle 4.2 zeigt eine Übersicht der publizierten Metabolitenkonzentrationen.

Effektor	Mesophyll mM	Bündelscheide mM	Autor
Glukose-6-P	3	2,3	LEEGOOD, 1985
Fruktose-6-P	1,8	1,4	LEEGOOD, 1985
Triosephosphat	11	1	STITT und HELDT, 1985
	14,8	7	LEEGOOD, 1985
	13,6*	2,8*	WEINER und HELDT, 1992
3-Phosphoglycerat	4	13	STITT und HELDT, 1985
	6	16	LEEGOOD, 1985
	8,8*	23,6*	WEINER und HELDT, 1992
Pyruvat	6	5	STITT und HELDT, 1985
	10,3	8,8	LEEGOOD, 1985
Phospho- <i>enol</i> -pyruvat	2	0,7	STITT und HELDT, 1985
	3	0,6	LEEGOOD, 1985
Malat	35	17	STITT und HELDT, 1985
	92,2	4,8	LEEGOOD, 1985
	36*	120*	WEINER und HELDT, 1992
Serin	4,4*	6*	WEINER und HELDT, 1992
Glycin	3,6*	5,6*	WEINER und HELDT, 1992
Alanin	34,5	36	LEEGOOD, 1985
	55,2*	72,8*	WEINER und HELDT, 1992
Glutamat	40	16,4	LEEGOOD, 1985
	27,8*	20,2*	WEINER und HELDT, 1992
Aspartat	5,2	6,6	LEEGOOD, 1985
	22,8*	21,2*	WEINER und HELDT, 1992

Tab. 4.2: Abgeschätzte Metabolitenkonzentrationen in Mesophyll- und Bündelscheidenzellen.

* Werte von WEINER und HELDT (1992) wurden zur besseren Vergleichbarkeit nach der Methode von LEEGOOD (1985) umgerechnet.

Vergleicht man die von STITT und HELDT (1985), LEEGOOD (1985) und WEINER und HELDT (1992) errechneten Daten miteinander, fallen die z.T. sehr erheblichen Unterschiede der Konzentrationen auf, welche eine genaue Abschätzung der Wirkung auf die Aktivität der PEPCase verhindern. Geht man überschlagend von ca. 90% Wassergehalt der Zellen aus, lassen sich die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werte der Metabolite näherungsweise in Konzentrationen umrechnen und so mit den Literaturwerten vergleichen (Tab. 4.3).

Effektor	E 36 Kontrolle	E 36 Streß	B 35 Kontrolle	B 35 Streß
	mM	mM	mM	mM
Pyruvat	0,55	0,55	0,8	0,44
Phospho- <i>enol</i> -pyruvat	0,33	n.n.	0,16	n.n.
Malat	14	25	19,5	36,6
Oxalacetat	0,5	0,23	0,8	n.n.

Tab. 4.3: Umrechnung der Metabolitgehalte in Konzentrationen. n.n.: Meßwert lag unter der Nachweisgrenze

Im Vergleich mit den Daten der anderen Arbeitsgruppen liegen die in dieser Arbeit ermittelten Werte niedriger, was möglicherweise auf die Unterschiede in der Umrechnung zurückzuführen ist.

Auffällig ist der starke Anstieg von Malat in den trockengestreßten Pflanzen. Obwohl die Rolle von Malat als kompetitiver Inhibitor der PEPCase vielfach beschrieben wurde (O'LEARY, 1982; ANDREO et al., 1987; STIBOROWA, 1988), ist der genaue Mechanismus der Inhibierung in Pflanzen noch nicht vollständig aufgeklärt. Bei einem pH-Wert von 7,15 wurde die PEPCase durch Anwesenheit von 10 mM Malat vollständig inhibiert, die gleiche Malatkonzentration hatte bei einem pH Wert von 7,9 keine meßbaren Auswirkungen auf die PEPCase-Aktivität (siehe Abb. 3.39). Dies korreliert auch mit den Beobachtungen anderer Autoren (JIAO et al., 1990; FURBANK et al., 2000).

Auch in vivo zeigte die PEPCase in Protoplasten aus *Sorghum bicolor* und *Digitaria sanguinalis* höhere Aktivität und verminderte Empfindlichkeit gegenüber Malat, wenn das Reaktionsmedium durch eine schwache Base (NH₄Cl) alkalisiert wurde (GIGLIOLI-GUIVARCH et al., 1996). Ob Malat dabei am katalytischen Zentrum bindet oder durch Bindung an regulatorische Zentren die Konformation der PEPCase verändert, ist dabei noch ungeklärt (JIAO et al., 1990; GAO und WOO, 1996). In *Escherichia coli*, dessen PEPCase eine hohe Übereinstimmung zu pflanzlichen PEPCasen aufweist, bindet Malat an ein Arginin (587) im katalytischen Zentrum, wodurch sich die räumliche Struktur des Enzyms ändert und die katalytische Aktivität sinkt (KAI et al., 1999).

Wie in CAM-Pflanzen (NIMMO et al., 1984) wird die Enzymaktivität auch in C₄-Pflanzen zusätzlich noch durch eine PEPCase-Phosphokinase (PEPCase-PK) reguliert (BUDDE und CHOLLET, 1986). Die Phosphorylierung bewirkt im gereinigten Enzym aus *Sorghum* eine Verdopplung von V_{max}, aber nur eine geringe Veränderung für den K_m-Wert von PEP. Gleichzeitig sinkt die Empfindlichkeit für Malat um das siebenfache, aber auch positive Effektoren wie Glukose-6-Phosphat wirken weniger stark (DUFF et al., 1995; COTELLE et al., 1999). Die Phosphorylierung der PEPCase an Position 8 und 15 des N-terminalen Endes (DUFF et al., 1993; Chollet et al., 1996; VIDAL und CHOLLET, 1997) wird durch Licht induziert, wobei das Verhältnis von phosphorylierter zu dephosphorylierter Form abhängig von der Lichtintensität ist (BAKRIM et al., 1992). Die bereits oben beschriebenen Effektoren (Malat; Glukose-6-Phosphat) können neben ihrer direkten Wirkung auf die PEPCase auch Einfluß auf die Phosphorylierung der PEPCase durch die PEPCase-PK nehmen (VIDAL et al., 2001). Ein Schema der Regulation zeigt Abbildung 4.1:

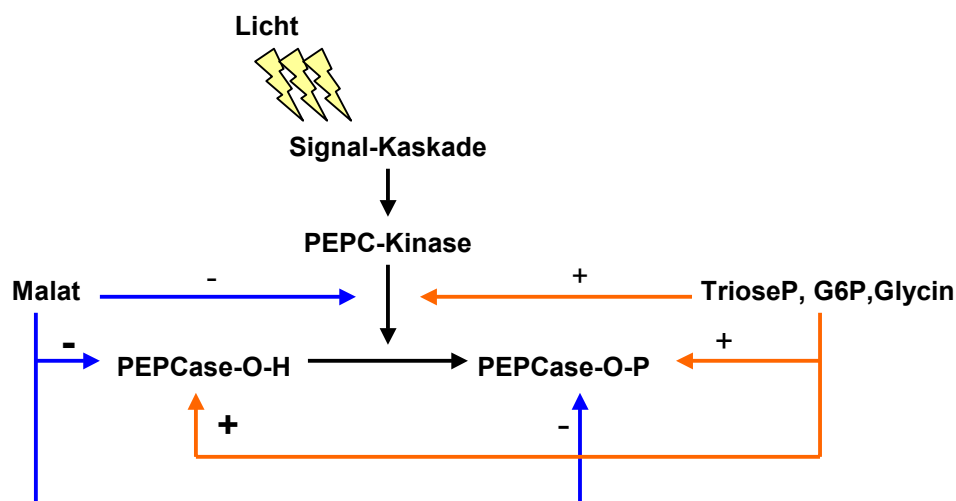


Abb. 4.1: Regulation der PEPCase durch Effektoren (verändert nach VIDAL et al., 2001)

Aufgrund der langsamen Regulation (1-2 h bis zur vollständigen Phosphorylierung im Licht) scheint die kurzfristige Regulation der PEPCase-Aktivität jedoch nicht über den Phosphorylierungsgrad, sondern durch die Konzentration der C₄-Metabolite bzw. Effektoren reguliert zu werden (ECHEVARRIA et al., 1994; VIDAL et al., 2001). Inwiefern die PEPCase-Aktivität auch durch 3-PGA aus dem Calvin-Zyklus der Bündelscheidenzellen reguliert wird und so eine Schlüsselposition in der Koordination zwischen C₄- und Calvin-Zyklus einnimmt, ist noch nicht restlos geklärt (VIDAL et al., 2001).

Legt man die verschiedenen publizierten Werte für Malat von 14 - 92 mM in den Mesophyllzellen für eine Abschätzung der PEPCase-Inhibierung in vivo zugrunde und unterstellt diese Konzentrationen im Cytosol, so würden alle berechneten Werte zu einer nahezu vollständigen Inhibierung der PEPCase in den Kontrollpflanzen führen (siehe Abb. 3.40). Das bedeutet, daß die Konzentration von Malat und anderer Effektoren in der Zelle nicht gleichverteilt sein kann, sondern in den einzelnen Kompartimenten unterschiedlich hoch sein muß. Tatsächlich befindet sich der größte Teil des Malats (>99%) in der Vakuole und ist somit als Inhibitor der PEPCase unwirksam (STITT und HELDT, 1985). Dabei könnte ein ähnlicher Konzentrationsgradient zwischen Vakuole und Cytosol herrschen wie in CAM-Pflanzen, die während der Nacht bis zu 170 µmol Malat/g Fw akkumulieren (LÜTTGE et al., 2002). Dies entspräche bei einem Wassergehalt der Zelle von 90% einer Konzentration von etwa 188 mM Malat. Da eine so hohe Malatkonzentration im Cytosol zur vollständigen Inaktivierung der PEPCase führen würde, muß die Pflanze eine geringere Malatkonzentration im Cytosol aufrecht erhalten, was z.B. durch einen Protonentransport in die Vakuole realisiert werden könnte. Im Gegensatz zu CAM-Pflanzen benötigen C₄-Pflanzen jedoch relativ hohe Malatkonzentrationen im Cytosol der Mesophyllzellen, um einen Diffusionsgradienten aufzubauen und damit den Transport von Malat in die Bündelscheidenzellen aufrecht zu erhalten. Nach verschiedenen theoretischen Überlegungen ist dazu ein Gradient von 2-20 mM Malat notwendig (HELDT, 1999; VIDAL et al., 2001). Diese Konzentrationen reichen jedoch bereits aus, um die maximale Aktivität der PEPCase in Verbindung mit dem physiologischen pH-Wert stark zu reduzieren (siehe Abb. 3.37-40). Trotz der Probleme bei der genauen Konzentrationsbestimmung aller

Metabolite in den Kompartimenten von Mesophyll- und Bündelscheidenzellen lassen die ermittelten Daten auf eine Veränderung des Metabolitpools unter Trockenstreßbelastung schließen. Die Akkumulation von Malat unter Trockenstreß führt dabei zu einer zunehmenden Inhibierung der PEPCase, die dadurch limitierend für die Photosynthese wird. Durch die höheren Malatgehalte der Sorte B 35 wird die Photosynthese unter Trockenstreß dabei früher inhibiert als bei der Sorte E 36, worauf auch die flacheren Kurven der trockengestreßten B 35 Pflanzen bei den Gaswechsellmessungen unter verringertem CO₂-Gehalt hindeuten (siehe Abb. 3.23).

MDH

Während in allen C₄-Pflanzen die Fixierung von CO₂ durch die PEPCase erfolgt, wird das entstehende Oxalacetat in den verschiedenen C₄-Typen unterschiedlich umgesetzt. In den NADP-ME Typ C₄-Pflanzen wird das Oxalacetat im Chloroplasten der Mesophyllzellen durch die Malatdehydrogenase unter NADPH-Verbrauch zu Malat reduziert. Die Enzymaktivität der MDH liegt dabei in diesem C₄-Typ etwa 10-20fach über der Aktivität anderer C₄-Typen und C₃-Pflanzen (HATCH, 1987). Die blattflächenbezogenen MDH-Aktivitäten in den beiden *Sorghum*-Kultivaren E 36 und B 35 liegen, ähnlich wie die PEPCase-Aktivität, deutlich über den jeweiligen Photosyntheseraten und scheinen bezüglich ihrer maximalen Umsatzraten die Photosynthese nicht zu limitieren (siehe Abb. 3.41). Wie bei der PEPCase deuten die hohen in vitro Aktivitäten auf eine starke Regulation der Enzymaktivität in vivo hin. Frühe Untersuchungen von sowohl von JOHNSON und HATCH (1970), als auch von HATCH (1977) und USUDA (1984) zeigten eine starke Lichtabhängigkeit der MDH-Aktivität. Weiterführende Arbeiten von EDWARDS et al. (1985), ASHTON und HATCH (1983a) und die Sequenzanalyse des Enzyms aus Mais und *Sorghum* von METZLER et al. (1989) und ISSAKIDIS et al. (1992) wiesen auf einen Thioredoxinregulierten Aktivierungsmechanismus der MDH hin, was durch Versuche mit degenerierten MDH-Mutationen bestätigt wurde (ISSAKIDIS et al., 1992, 1994; SCHEPENS et al., 2000; MIGINIAC-MASLOW, 2000). Demnach erfolgt die Regulation des Enzyms durch zwei Disulfidbrücken (HATCH und AGOSTINO, 1992; LEMAIRE et al., 1994), die zur Aktivierung beide reduziert werden müssen. In C₃-Pflanzen kann durch die Thioredoxin vermittelte Aktivierung der MDH überschüssige Energie der Chloroplasten durch das Malatventil abgeführt werden (SCHEIBE und STITT, 1988). Um zu überprüfen, ob dieser Mechanismus bei der Regulation der Photosynthese von *Sorghum* unter Trockenstreß eine Rolle spielt, wurde der Aktivierungsgrad der MDH in beiden Kultivaren unter Trockenstreß ermittelt. Dabei zeigten die Kultivare beider Sorten eine geringere Aktivierung als in den jeweiligen Kontrollen (siehe Abb. 3.42). Trotz des geringeren Aktivierungsgrades der trockengestreßten Pflanzen lag die blattflächenbezogene Enzymaktivität deutlich über der Photosyntheserate, so daß der Aktivierungsgrad der MDH wahrscheinlich nicht als entscheidender Regulator der Photosynthese unter Trockenstreß in Frage kommt. Die MDH-Aktivität könnte jedoch in vivo durch weitere Regulatoren noch weiter reduziert sein und somit zum limitierenden Faktor der Photosynthese werden. Nach ASHTON und HATCH (1983b) wird die MDH mittels einer Endprodukthemmung durch NADP stark gehemmt. Sollte sich das NADP/NADPH-Verhältnis der

trockengestreßten Pflanzen auf die Seite von NADP verschieben, könnte in Verbindung mit dem geringeren Reduktionsgrad daraus eine Hemmung der MDH erfolgen. Gegen diese Hypothese sprechen allerdings die gemessenen Konzentrationen der C₄-Metabolite (siehe Abb. 3.54-57 und Tab. 4.3). Wenn die Aktivität der MDH sinkt, wären steigende Oxalacetat- und sinkende Malat Konzentrationen in den trocken-gestreßten Blättern zu erwarten. Tatsächlich passiert jedoch das Gegenteil, weshalb eine Limitierung der Photosynthese durch sinkende MDH-Aktivität unwahrscheinlich ist.

NADP-ME

In den Chloroplasten der Bündelscheidenzellen wird das im Mesophyll gebildete Malat durch das NADP-Malatenzym decarboxyliert, wobei neben CO₂ auch Reduktionsäquivalente entstehen, die im Calvin-Zyklus benötigt werden, da den Bündelscheidenchloroplasten der C₄-NADP-ME-Typen die Granathylakoide mit PS II weitgehend fehlen und somit kein NADPH produziert werden kann.

Die blattflächenbezogene Aktivität des ME in den Enzymextrakten beider *Sorghum*-Kultivare liegt deutlich über den Photosyntheseraten, was auch für andere Arten wie Mais (HATCH, 1987) und Zuckerrohr (DU et al., 1996) beschrieben wurde. Im Gegensatz zur PEPCase haben Metabolite bei diesem Enzym nur einen geringen Einfluß auf die Enzymaktivität (EDWARDS und ANDREO, 1992). Die Aktivierung des ME erfolgt vermutlich auch durch Thioredoxin, obwohl das ME in Enzymextrakten im Gegensatz zur MDH auch ohne Reduktionsmittel aktiviert vorliegt (DRINCOVICH und ANDREO, 1994). Eine mögliche Regulation der Photosynthese durch das ME in vivo, könnte sich aus der Aktivitätsänderung durch Änderung des pH-Wertes ergeben. In Mais steigt die Aktivität des ME zwischen pH 7 und 8 um das 10fache an, wodurch das Enzym bei steigendem pH im belichteten Chloroplasten reguliert werden könnte (EDWARDS und ANDREO, 1992). Als Cofaktor des ME wirkt Mg²⁺, dessen Konzentration in belichteten Chloroplasten ebenfalls ansteigt. Als kompetitiver Inhibitor des ME wirkt NADPH (ASAMI et al., 1997; EDWARDS und ANDREO, 1992), wodurch auch der Kohlenstofffluß zwischen C₃- und C₄-Stoffwechsel reguliert werden könnte. Sinkt die Umsatzrate des Calvin-Zyklus, wird NADP nicht schnell genug regeneriert, wodurch das Verhältnis von NADPH/NADP steigt, was zu sinkender Aktivität des ME führt. In der Folge würde Malat in den Bündelscheiden- und Mesophyllzellen akkumulieren und die PEPCase-Aktivität senken. Andererseits erscheint dieser Mechanismus unwahrscheinlich, da aufgrund des fehlenden PS II NADPH in den Bündelscheidenchloroplasten nicht produziert werden kann, weshalb ein Teil des PGA zur Reduktion in die Mesophyllzellen transportiert werden muß. Eine Akkumulation von NADPH in den Bündelscheidenzellen erscheint aus diesem Grund eher fraglich.

PPDK

Die Pyruvat-orthophosphat-dikinase, welche im Chloroplasten der Mesophyllzellen aus Pyruvat den primären CO_2 -Akzeptor, Phospho-*enol*-pyruvat, regeneriert, nimmt aufgrund verschiedener Besonderheiten ihrer Eigenschaften eine Sonderstellung unter den C_4 -Enzymen ein. Neben Pyruvat wird im gleichen Reaktionsschritt auch ein Phosphat phosphoryliert, wobei die γ - und β -Phosphatreste des ATP übertragen werden (HATCH und SLACK, 1968). Die ermittelten Enzymaktivitäten in den Kontrollpflanzen der beiden *Sorghum*-Kultivare liegen nur knapp über den jeweiligen Photosyntheseraten (siehe Abb. 3.36), was durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigt wird (BAER und SCHRADER, 1985; HATCH, 1987; DU et al., 1996). Die hohe Korrelation von PPDK-Aktivität und Photosyntheserate, sowie die starke Regulation der Enzymaktivität lassen vermuten, daß es sich bei der PPDK um ein Schlüsselenzym des C_4 -Stoffwechsels handelt. Die PPDK unterliegt einer starken Endprodukthemmung durch alle drei entstehenden Endprodukte (EDWARD et al., 1985), Mg^{2+} , NH_4^+ und K^+ führen zu einer Aktivitätssteigerung (JENKINS und HATCH, 1985). Die wichtigste Regulation der Aktivität erfolgt jedoch durch die lichtgesteuerte Phosphorylierung der PPDK (BURNELL und HATCH, 1985). Im Gegensatz zu PEPCase und anderen durch Phosphorylierung regulierten Enzymen ist die PPDK in ihrer phosphorylierten Form inaktiv. Ungewöhnlich dabei ist die direkte Phosphorylierung im katalytischen Zentrum der PPDK, sowie ADP als Phosphatdonor. Im Licht kommt es nach kurzer Zeit zur vollen Aktivierung, die durch das gleiche Enzyme vermittelt wird wie die Inaktivierung und als "PPDK-Regulatorprotein" bezeichnet wird (USUDA et al., 1984). Obwohl der genaue Mechanismus bei dem Licht die Aktivierung des Regulatorproteins bewirkt, noch nicht vollständig aufgeklärt ist, gibt es starke Hinweise auf eine Regulation über lichtinduzierte Änderungen des ATP/ADP-Verhältnisses im Chloroplasten (EDWARDS et al., 1985; BUDDE et al., 1986; NAKAMOTO und EDWARDS, 1987; ROESKE und CHOLLET, 1989).

Daß die PPDK-Aktivität unter Trockenstreß den limitierenden Faktor für die Photosynthese in den darstellt, wie von verschiedenen Autoren angenommen (CONTOUR-ANSEL et al., 1996; DU et al., 1996; BAER und SCHRADER, 1985), ist aufgrund der im Vergleich zur Photosynthese höheren Enzymaktivität in den untersuchten *Sorghum*-Kultivaren unwahrscheinlich.

Rubisco

Die Rubisco ist das Schlüsselenzym des Calvin-Zyklus und Gegenstand intensiver Forschung. Obwohl ihre komplexe Regulation in C_3 -Pflanzen weitestgehend aufgeklärt wurde (FARQUHAR und SHARKEY, 1982; GUTTERIDGE und JORDAN, 2001; LEEGOOD 1985; STITT und SCHULZE, 1994), ist über ihre Rolle in der photosynthetischen Kontrolle von C_4 -Pflanzen bislang nur wenig bekannt. Ein Grund dafür ist wiederum in der schwierigen Trennung von Mesophyll und Bündelscheidenzellen zu sehen, die eine exakte quantitative Bestimmung der Metabolitenkonzentrationen verhindert, die die Rubisco-Aktivität mitregulieren (SERVAITES und GEIGER, 1995).

Bei den Untersuchungen an den beiden *Sorghum*-Kultivaren ergab sich das Problem, daß die blattflächenbezogenen Enzymaktivitäten der Kontrollpflanzen deutlich niedriger lagen als die jeweiligen

Photosyntheseraten (siehe Abb. 3.48). Aufgrund der hohen Enzymaktivitäten des ME und den aus den Acrylamidgelen ermittelten hohen Gehalten von Rubisco in den Extrakten konnte aber eine unvollständige Extraktion aus den Bündelscheidenzellen ausgeschlossen werden.

Nach SEEMAN et al. (1984), unterscheidet sich die Rubisco aus C₄-Pflanzen von dem Enzym aus C₃-Spezies hinsichtlich ihrer kinetischen Eigenschaften. Demnach ist die maximale spezifische Aktivität in C₄-Pflanzen etwa doppelt so hoch wie in C₃-Pflanzen, gleichzeitig sinkt jedoch die Affinität für CO₂ um etwa die Hälfte ab. Ein Vergleich der spezifischen Rubisco-Aktivität aus *Sorghum* und der C₃-Pflanze *Lycopersicon esculentum* ließ auf einen Aktivitätsverlust der Rubisco während der Extraktion aus *Sorghum* schließen, da die ermittelte spezifische Aktivität aus den Extrakten beider Pflanzen ungefähr gleich groß war (siehe Tab. 3.4).

Wodurch der Aktivitätsverlust der *Sorghum*-Extrakte verursacht wurde, konnte nicht geklärt werden. Da die Aufarbeitung der Proben nach dem gleichen Protokoll erfolgte wie bei *Lycopersicon*, erscheint eine Inaktivierung durch äußere Einflüsse unwahrscheinlich. Möglicherweise kam es durch die Extraktion zu einer Freisetzung von endogenen Inhibitoren, welche die Rubisco inhibierten. In der Literatur sind unterschiedliche Inhibitoren, wie z.B. 2-Carboxy-D-Arabinitol-1-phosphat oder Xylulose-1,5-phosphat beschrieben (KHAN et al., 1999; PARRY et al., 1997; KEYS et al., 1995). Die unterschiedlichen Gehalte dieser Inhibitoren in verschiedenen Spezies (KEYS et al., 1995) könnten die niedrigen Rubisco-Aktivitäten der *Sorghum*-Extrakte verursachen.

Trotz der niedrigen gemessenen Aktivität der Rubisco erscheint es unwahrscheinlich, daß die Photosyntheserate durch die Rubisco limitiert wird. Unterstellt man anhand der von SEEMAN (1984) publizierten Daten, daß die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten blattflächenbezogenen Aktivitäten der Rubisco um etwa die Hälfte geringer sind als in vivo, wäre die Rubisco-Aktivität in vivo deutlich höher als die Photosyntheserate. Generell liegen die gemessenen Rubisco-Aktivitäten der gestreßten Pflanzen im Verhältnis zur Photosynthese höher als in den Kontrollpflanzen, was eine Limitierung der Photosynthese unter Trockenstreß ebenfalls unwahrscheinlich macht. Darüber hinaus war kein Unterschied der Rubisco-Aktivität zwischen den beiden *Sorghum*-Linien zu erkennen, der die unterschiedliche Trockenstreßtoleranz der beiden Sorten erklärt. Arbeiten an anderen C₄-Pflanzen wie Zuckerrohr und Mais deuten ebenfalls darauf hin, daß die Rubisco nicht das limitierende Enzym des Kohlenstoff Umsatzes darstellt (DU et al., 1996; BAER und SCHRADER, 1985). Unterstützt wird diese Interpretation durch den Vergleich der Photosynthese unter Trockenstreß mit den Rubisco-Gehalten in fünf *Sorghum*-Kultivaren von JAGTAP et al., (1998). Die unter Streß unterschiedlich stark verminderten Rubisco-Gehalte zeigten dabei keine Korrelation mit den Photosyntheseraten, was ebenfalls gegen eine Limitierung der Photosynthese durch die Rubisco spricht.

FBPase

Neben der Rubisco ist die Fruktose-1,6-bisphosphatase möglicherweise ein weiteres Schlüsselenzym des Calvin-Zyklus. Genau wie die Rubisco ist die FBPase in C_4 -Pflanzen ausschließlich in den Bündelscheidenzellen lokalisiert (FURBANK et al., 1985; HATCH und KAGAWA, 1973). Das isolierte Enzym aus Mais zeigt dabei starke Homologie zur FBPase aus C_3 -Pflanzen (NISHIZAWA und BUCHANAN, 1981). Wie auch bei der Malatdehydrogenase erfolgt die Regulation der FBPase in C_3 - und C_4 -Pflanzen mittels Thioredoxin durch das Licht (ASHTON et al., 1990). Trotzdem lassen Untersuchungen der Metabolitpools unter verschieden starker Belichtung darauf schließen, daß die Thioredoxin vermittelte Aktivierung in C_4 -Pflanzen für die Regulation der Photosynthese eine wesentlich geringere Rolle spielt, als in C_3 -Spezies (LEEGOOD et al., 1989).

Wie bei den von DU et al. (1996) für Zuckerrohr erhobenen Daten, zeigt sich auch bei den beiden untersuchten *Sorghum*-Kultivaren eine positive Korrelation zwischen Photosynthese und Enzymaktivität (siehe Abb. 3.49). Trotzdem liegen die ermittelten Aktivitäten sowohl in den gestreßten, wie auch den Kontrollpflanzen jeweils über der Photosyntheserate und scheinen nicht limitierend für die Photosyntheserate zu sein. Wie schon bei der Rubisco-Aktivität ist auch bei der FBPase kein Unterschied zwischen den beiden Kultivaren zu erkennen, der die unterschiedliche Trockenstresstoleranz verursachen könnte.

4.4 Schlußfolgerungen

Betrachtet man die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit im Zusammenhang und vergleicht sie mit Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen zu diesem Thema, lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

Die großen Unterschiede der verschiedenen Autoren bei der Beurteilung, ob die zurückgehende Photosyntheseleistung unter Trockenstreß bei C_4 -Pflanzen auf stomatäre- oder nicht-stomatäre Effekte zurückzuführen sei, sind ein Indiz dafür, daß diese Form des Stresses in der Pflanze zu sehr komplexen und vielschichtigen Reaktionen führt. Die Effekte die durch den Trockenstreß induziert werden, hängen dabei sehr stark von der Dauer und Intensität, aber auch vom Entwicklungszustand der Pflanze und der untersuchten Spezies ab, wodurch sich die z.T. widersprüchlichen Ergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen erklären lassen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente weisen darauf hin, daß der Rückgang der Photosynthese trotz der strengen Korrelation zwischen stomatärem Widerstand und Photosynthese hauptsächlich auf nicht-stomatäre Effekte zurückzuführen ist. Dabei kommt es durch den Trockenstreß zu einer Akkumulation von Malat im Cytoplasma der Mesophyllzellen, wodurch die Aktivität der PEPCase inhibiert wird. Diese Reaktion findet in beiden untersuchten Kultivaren statt, die relative Zunahme der Malatkonzentration ist dabei in beiden Sorten gleich hoch. Da der Malatgehalt der Sorte B 35 jedoch unter Kontrollbedingungen bereits über dem der Sorte E 36 liegt, scheint unter Streß schneller ein kritischer Wert erreicht zu werden, ab dem der Umsatz der PEPCase zum limitierenden Schritt der Photosynthese wird. Die sinkende PEPCase-Aktivität führt zu einer geringeren

CO₂-Aufnahme aus dem Interzellularraum, wodurch der CO₂-Gehalt im Blattinneren verhältnismäßig ansteigt. Da die Öffnungsweite der Stomata neben Wasser auch durch den CO₂-Gehalt im Blattinneren reguliert wird, führt der höhere CO₂-Gehalt zum teilweisen Schließen der Stomata. Ob die von einigen Autoren (z.B. MASSACCI et al., 1996; ACKERSON et al., 1980) gefolgerte Kausalität von schließenden Stomata zu → sinkender Photosynthese zutrifft, oder ob nicht sinkende Photosynthese zu → schließenden Stomata führt, läßt sich nur durch weiterführende Messungen des interzellulären CO₂-Gehaltes, oder Photosynthesemessungen unter veränderten CO₂-Gehalten der Atmosphäre bestimmen. Möglicherweise wurden von verschiedenen Autoren durch die Wahl unterschiedlicher Modellsysteme (siehe 4.1) und verschieden alter Pflanzen, sowohl stomatäre-, als auch nicht-stomatäre Effekte beobachtet, welche die z.T. widersprüchlichen Publikationen erklären können. Dabei könnte insbesondere die Streßdauer von besonderer Bedeutung sein. So könnte Trockenstreß in einer ersten Phase zu einer Änderung der C₄-Metabolitkonzentrationen und damit zu sinkender PEPCase-Aktivität führen, wie sie in dieser Arbeit beobachtet werden konnte. Bei längerer Streßdauer könnte es zu einer Adaption kommen, durch den sich die Metabolitgehalte wieder normalisieren und stomatäre Faktoren die Photosynthese regulieren, worauf z.B. die von MASSACCI et al. (1996) publizierten Daten hindeuten.

Welche Faktoren zur Veränderung der Malatkonzentration in den gestreßten Pflanzen führen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Eine mögliche Erklärung, wäre die Konzentrationserhöhung durch Verlust des Lösungsmittels Wasser unter Trockenstreß. Betrachtet man das Wassersättigungsdefizit der gestreßten Pflanzen (siehe Abb. 3.4), verlieren die gestreßten Pflanzen mit einem mittleren Blattpotential von -15 bar etwa 1/5 ihres Wassergehaltes im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Durch diesen verhältnismäßig geringe Wasserverlust kann die Konzentrationserhöhungen der Malatgehalte um ca. 75% jedoch nicht erklärt werden. Ein weiterer Grund der gegen diesen Mechanismus spricht, ist der sinkende Gehalt der anderen C₄-Metabolite. Bei einem rein passiven Vorgang durch Wasserverlust wäre eine höhere Konzentration aller Metabolite zu erwarten gewesen, die jedoch nicht beobachtet wurde.

Vielmehr weisen die veränderten Metabolitgehalte auf eine Störung im weiteren Kohlenstoffmetabolismus hin. Die zwei untersuchten Schlüsselenzyme des Calvin-Zyklus (Rubisco/FBPase) scheinen von ihrer maximalen Aktivität nicht limitierend für die Photosynthese zu sein; ob sie möglicherweise in vivo einer Herabregulierung durch Effektoren unterliegen, konnte wie auch bei den Enzymen des C₄-Zyklus mit den verwendeten Techniken nicht ermittelt werden.

5 Zusammenfassung

Erstes Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Anzuchtssystems, mit dem ein reproduzierbarer Trockenstreß induziert werden konnte. Mittels dieses Systems erfolgte die Selektion von zwei unterschiedlich trockentoleranten *Sorghum bicolor*-Kultivaren, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit näher charakterisiert wurden. Dabei wurden zunächst Photosynthese, stomatärer Widerstand, Chlorophyll- und Carotinoidgehalt, F_v/F_m -Verhältnis, Blattdruckpotential und Blattschädigungen an allen Blättern von Kontrollpflanzen und gestreßten Pflanzen untersucht. Das jüngste, voll entwickelte Blatt wies die größten Unterschiede zwischen beiden Kultivaren auf, weshalb die weiterführende Untersuchungen nur noch an diesem Blatt durchgeführt wurden. Im Rahmen dieser Untersuchungen erfolgten Gaswechsel- und Chlorophyllfluoreszenz-Messungen unter unterschiedlicher CO_2 -Versorgung, sowie Messungen der blattflächenbezogenen Aktivität der C_4 -Enzyme (PEPCase, MDH, NADP-ME, PPDK) und zweier Enzyme des Calvin-Zyklus (Rubisco, FBPase). Darüber hinaus wurde der Gehalt der C_4 -Metabolite bestimmt und mittels Pigmentanalyse die Kinetik der Xanthophyll-Deepoxidation in Abhängigkeit vom Trockenstreß untersucht.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

Das verwendete Modellsystem erlaubt eine reproduzierbare Induktion des Trockenstresses. Aufgrund der relativ schnellen Änderung des Wasserpotentials des Bodens während der Versuchsdauer muß das Blattdruckpotential als Standard für die Trockenstreßbelastung gemessen werden.

Es konnten zwei *Sorghum*-Kultivare mit unterschiedlicher Trockenstreßresistenz selektiert werden. Die äthiopische Landrasse E 36 zeigt dabei trotz größerer Blattschädigung, insbesondere der älteren Blätter, unter vergleichbarem Blattdruckpotential jeweils höhere Photosyntheseraten der ungeschädigten Bereiche als die amerikanische Zuchtsorte B 35.

Trotz hoher Korrelation zwischen Photosyntheserate und stomatärem Widerstand scheint die Photosynthese unter Trockenstreß nicht durch verringerte CO_2 -Konzentrationen im Interzellularraum limitiert zu werden, worauf auch die Daten der Fluoreszenz- und Gaswechsellmessungen unter erhöhtem CO_2 -Gehalt hinweisen. Gaswechsellmessungen unter vermindertem CO_2 -Gehalt bei gestreßten Pflanzen lassen auf eine geringere Aktivität der CO_2 -Fixierung durch die PEPCase schließen.

Unter optimalen Bedingungen ist keine der in vitro gemessenen Umsatzraten der C_4 -Enzyme limitierend für die Photosynthese. In vivo könnte die Aktivität der PEPCase jedoch durch einen niedrigeren pH-Wert des Cytosols und Malathemmung zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt werden und die Photosyntheserate limitieren. Die starke Übereinstimmung von PPDK-Aktivität und Photosynthese in den Kontrollpflanzen weist auf eine mögliche Limitierung der Photosynthese durch die PPDK unter Kontrollbedingungen hin.

Die starken Veränderungen der C_4 -Metabolit Gehalte deuten auf eine grundlegende Veränderung des C_4 -Stoffwechsels unter Trockenstreß hin. Höhere Malat Konzentrationen der Sorte B 35 könnten dabei zu einer frühen Inhibierung der PEPCase in den trockengestreßten Pflanzen als in E 36 führen, wodurch die Photosynthese limitiert wird.

I Quellenverzeichnis

- Ackerson, R.C., Krieg, D.R., Sung, F.J.M.** (1980): Leaf conductance and osmoregulation of field grown sorghum genotypes. *Crop Science* 20: 10 - 14
- Adams, W.W., Demmig-Adams, B., Verhoeven, A.S., Baker, D.** (1994): Photoinhibition during winter stress: involvement of sustained xanthophyll cycle dependent energy dissipation. *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 261 - 276
- Alberda, T.H.** (1969): The effect of low temperature on dry matter production, chlorophyll concentration and photosynthesis of maize plants of different ages. *Acta Botanica Neerl.* 18:39 - 49
- Andreo, C.S., Gonzalez, D.H., Iglesias, A.A.** (1987): Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase: Structure and regulation. *FEBS Letters* 213: 1 - 8
- Aro, E.-M., Virgin, I., Andersson, B.** (1993): Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta* 1143: 113 - 134
- Ashton, A.R., Burnell, J.N., Furbank, R.T., Jenkins, C.L.D., Hatch, M.D.** (1990): Enzymes of C₄ photosynthesis. In "Methods of plant biochemistry", Vol. 3. Ed: Lea, P.J.
- Ashton, A.R., Hatch, M.D.** (1983a): Regulation of C₄ photosynthesis: Physical and kinetic properties of active (dithiol) and inactive (disulfide) NADP-malate dehydrogenase from *Zea mays*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 227(2): 406 - 415
- Ashton, A.R., Hatch, M.D.** (1983b): Regulation of C₄ photosynthesis: Regulation of activation and inactivation of NADP-malate dehydrogenase by NADP and NADPH. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 227(2): 416 - 424
- Badiani, M., Paolacci, A.R., Fusari, A., D'Ovido, R., Scandalios, J.G., Porceddu, E., Sermanni, G.G.** (1997): Non-optimal growth temperatures and antioxidants in the leaves of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. II. Short term acclimation. *Journal of Plant Physiology* 151: 409 - 421
- Baer, G.R., Schrader, L.E.** (1985): Relationships between CO₂ exchange rates and activities of pyruvate, P_i, dikinase and ribulose biphosphate carboxylase, chlorophyll concentration and cell volume in maize leaves. *Plant Physiology* 77: 612 - 616

- Bakrim, N., Echevarria, C., Crétin, C., Arrio-Dupont, M., Pierre, J.N., Vidal, J., Chollet, R., Gadal, P.** (1992): Regulatory phosphorylation of *Sorghum* leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: Identification of the protein serine kinase and some elements of the signal transduction cascade. *European Journal of Biochemistry* 204: 821 - 830
- Barth C., Krause, G.H., Winter, K.** (2001): Responses of photosystem I compared with photosystem II to high-light stress in tropical shade and sun leaves. *Plant, Cell and Environment* 24: 163 - 176
- Basnayake, J., Cooper, M., Ludlow, M.M., Henzell, R.G., Snell, P.J.** (1995): Inheritance of osmotic adjustment to water stress in three grain sorghum crosses. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 675 - 682
- Berkowitz, G.A., Chen, C., Gibbs, M.** (1983): Stromal acidification mediates in vivo water stress inhibition of nonstomatal controlled photosynthesis. *Plant Physiology* 72: 1123 - 1126
- Berkowitz, G.A., Gibbs, M.** (1983a): Reduced osmotic potential effects on photosynthesis. *Plant Physiology* 71: 905 - 911
- Berkowitz, G.A., Gibbs, M.** (1983b): Reduced osmotic potential inhibition on photosynthesis. *Plant Physiology* 72: 1100 - 1109
- Björkman, O., Demmig, B.** (1987): Comparison effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77K) and photon yield of O₂ evolution in leaves of higher plants. *Planta* 171: 171 - 184
- Blackman, P.J., Davies, W.J.** (1985): Root to shoot communication in maize plants and the effects of soil drying. *Journal of Experimental Botany* 36: 39 - 48
- Blum, A., Mayer, J., Golan, G.** (1989): Agronomic and physiological assessments of genotypic variation for drought resistance in sorghum. *Australian Journal of Agricultural Research* 40: 49 - 61
- Borrell, A., Hammer, G., van Oosterom, E.** (2001): Stay-green: A consequence of the balance between supply and demand for nitrogen during grain filling? *Annals of Applied Biology* 138: 91 - 95
- Boyer, J.S.** (1982): Plant productivity and environment. *Science* 218: 443 - 448
- Bradford, K.J., Hsiao, T.C.** (1982): Physiological responses to moderate water stress. In: "Encyclopedia of plant physiology", Springer Verlag, Berlin.

- Brown, H.R.** (1997): Analysis of bundle sheath conductance and C₄ photosynthesis using a PEP-carboxylase inhibitor. *Australian Journal of Plant Physiology* 24: 549 - 554
- Brüggemann, W.** (1992): Low-temperature limitations of photosynthesis in three *Vigna* species: A chlorophyll fluorescence study. *Photosynthesis Research* 34: 301 - 310
- Brüggemann, W. et al.** (1995): Chilling sensitivity of photosynthesis: Ecophysiological studies in two *Lycopersicon* species of different chilling tolerance. *Acta Physiologia Plantarum* 17(2): 113 - 122
- Brüggemann, W., Dauborn, B.** (1993): Long-term chilling of young tomato plants under low light. III. Leaf development as reflected by photosynthesis parameters. *Plant and Cell Physiology* 34(8): 1251 - 1257
- Brüggemann, W., Klaucke, S., Maas-Kantel, K.** (1994): Long-term chilling of young tomato plants under low light. V. Kinetic and molecular properties of two key enzymes of the Calvin cycle in *Lycopersicon esculentum* Mill. and *L. peruvianum* Mill. *Planta* 194: 160 - 168
- Brüggemann, W., Koroleva, O.Y.** (1995): Chilling sensitivity of violaxanthin deepoxidation inhibits the development of energy-dependent chlorophyll fluorescence quenching in vivo. *Plant Physiology and Biochemistry* 33 (2): 251 - 259
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L.** (2000): *Biochemistry and molecular biology of plants.* American society of plant physiologists, Rockville, Maryland.
- Budde, R.J., Ernst, S.M., Chollet, R.** (1986): Substrate specificity and regulation of the maize (*Zea mays*) leaf ADP: protein-phospho-transferase catalysing the inactivation of pyruvate, orthophosphate dikinase. *Biochemical Journal* 236: 579 - 584
- Budde, R.J.A., Chollet, R.** (1986): In vitro phosphorylation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiology* 82: 1107 - 1114
- Burnell, J.N., Hatch, M.D.** (1985): Light. dark modulation of leaf pyruvate, P_i dikinase. *Trends in Biochemical Sciences* 10: 288 - 291
- Butler, W.L., Kitajima, M.** (1975): Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 376: 116 - 125
- Catsky, J.** (1960): Determination of water deficit in disks cut out from leaf blades. *Biologia Plantarum* 2: 76 - 78

Cerling, T.E., Wang, Y., Quade, J. (1993): Expansion of C₄ ecosystems as an indication of global ecological change in the late Miocene. *Nature* 361: 344 - 345

Chitty, J.A., Furbank, R.T., Marshall, J.S., Chen, Z., Taylor, W.C. (1994): Genetic transformation of the C₄ Plant *Flaveria bidentis*. *The Plant Journal* 6: 949 - 956

Chollet, R., Vidal, J., O'Leary, M.H. (1996): Phosphoenolpyruvate carboxylase: A ubiquitous highly regulated enzyme in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 273 - 298

Cogdell, R. (1988): The function of pigments in chloroplasts.
In: "Plant Pigments", ed. by T. W. Goodwin, Academic Press, London

Conley, M.M., Kimball, B.A., Brooks, T.J., Pinter Jr., P.J., Hunsaker, D.J., Wall, G.W., Adam, N.R., Lamotte, R.I., Matthias, A.D., Thompson, T.L., Leavitt, S.W., Ottman, M.J., Cousins, A.B., Triggs, J.M. (2001): CO₂ enrichment increase water-use efficiency in sorghum.
New Phytologist 151: 407 - 412

Contour-Ansel, D., Ilami, G., Ouarzane, A., Louguet, P. (1996): Effect of water stress on pyruvate, P_i, dikinase and phosphoenolpyruvate carboxylase activities in the leaves of two cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science* 176: 59 - 69

Corlett, J.H., Jones, H.G., Mssacci, A., Masojidek, J. (1994): Water deficit, leaf rolling and susceptibility to photoinhibition in field grown sorghum. *Physiologia Plantarum* 92: 423 - 430

Cornic, G. (2000): Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture - not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science* 5: 187 - 188

Cornic, G., LeGoutallec, J.L., Hodges, M. (1989): Effect of dehydration and high light on photosynthesis of two C₃ plants (*Phaseolus vulgaris* L. and *Elastoma repens* (Lour.) Hall f.). *Planta* 177: 84 - 90

Cornish, K., Zeevaard, J.A.D. (1985): Movement of abscisic acid into the apoplast in response to water stress in *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiology* 78: 623 - 626

Cotelle, V., Pierre, J.N., Vavasseur, A. (1999): Potential strong regulation of guard cell phosphoenolpyruvate carboxylase through phosphorylation. *Journal of Experimental Botany* 50 (335): 777 - 783

Cousins, A.B., Adam, N.R., Wall, G.W., Kimball, B.A., Pinter Jr, P.J., Leavitt, S.W., LaMorte, R.L., Matthias, A.D., Ottman, M.J., Thompson, T.L., Webber, A.N. (2001): Reduced photorespiration and increased energy-use efficiency in young CO₂-enriched sorghum leaves. *New Phytologist* 150: 275 - 284

Cousins, A.B., Adam, N.R., Wall, G.W., Kimball, B.A., Pinter Jr, P.J., Ottman, M.J., Leavitt, S.W., Webber, A.N. (2002): Photosystem II energy use, non-photochemical quenching and the xanthophyll cycle in *Sorghum bicolor* grown under drought and free air CO₂ enrichment (FACE) conditions. *Plant, Cell and Environment* 25: 1551 - 1559

Davies, B. H. (1976): Carotenoids. In: "Chemistry and Biochemistry of plant pigments", ed. by T.W. Goodwin, Academic Press, London

Dekleva, M.L., Strohl, W.R. (1988): Activity of phosphoenolpyruvate carboxylase of an anthecline-producing streptomycete. *Canadian Journal of Microbiology* 34: 1241 - 1246

Demmig-Adams, B. (1990): Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1020: 1 - 24

Demmig-Adams, B., Adams, W.W. (1992): Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 599 - 626

Donatelli, M., Hammer, G.L., Vanderlip, R.L. (1992): Genotype and water limitation effects on phenology, growth and transpiration efficiency in grain sorghum. *Crop Science* 32: 781 - 786

Doncaster, H., Leegood, R.C. (1997): Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activity in maize leaves. *Plant Physiology* 84: 82 - 87

Du, Y.C., Kawamitsu, Y., Nose, A., Hiyane S., Murayama, S., Wasano, K., Uchida, Y. (1996): Effects of water stress on carbon exchange rate and activities of photosynthetic enzymes in leaves of Sugarcane (*Saccharum sp.*). *Australian Journal of Plant Physiology* 23: 719-726

Duff, S.M.G., Andreo, C.S., Pacquit, V., Lepiniec, L., Sarath, G., Condon, S.A., Vidal, J., Gadal, P., Chollet, R. (1995): Kinetic analysis of the non-phosphorylated, in vitro phosphorylated, and phosphorylation site mutant (Asp8) forms of intact recombinant C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase from *Sorghum*. *European Journal of Biochemistry* 228: 92 - 95

Duff, S.M.G., Lepiniec, L., Cretin, C., Andreo, C.S., Condon, S.A., Sarath, G., Vidal, J., Gadal, P., Chollet, R. (1993): an engineered change in the L-malate sensitivity of a site-directed mutant of *Sorghum* phosphoenolpyruvate carboxylase: The effect of sequential mutagenesis and S-carboxymethylation at position 8. Archives of Biochemistry and Biophysics 306: 272 - 276

Duncan, R.R., Bockholt, A.J., Miller, F.R. (1981): Descriptive comparison of senescent and nonsenescent *Sorghum* genotypes. Agronomy Journal 73: 849 - 853

Echevarria, C., Pacquit, V., Bakrim, N., Osuna, L., Delgado, B., Arrio-Dupont, M., Vidal, J. (1994): The effect of pH on the covalent and metabolic control of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase from *Sorghum* leaf. Archives of Biochemistry and Biophysics 315: 425 - 430

Edwards, G.E., Nakamoto, H., Burnell, J.N., Hatch, M.D. (1985): Pyruvate, P_i dikinase and NADP malate dehydrogenase in C₄ photosynthesis. Annual Review of Plant Physiology 36: 255 - 286

Färber, Andreas (1998): Regulation und Funktion des Xanthophyllzyklus höherer Pflanzen. Dissertationsschrift der Universität Düsseldorf.

Farquhar, G.D., Sharkey, T.D. (1982): Stomatal conductance and photosynthesis. Annual Review of Plant Physiology 33: 317 - 345

Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, K.J. (1994): Photooxidative stress in plants. Physiologia Plantarum 92: 696 - 717

Franke, W. (1989): Nutzpflanzenkunde. 4.Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart

Furbank, R.T., Chitty, J.A., Jenkins, C.L.D., Taylor, W.C., Trevanion, S.J., von Caemmerer, S., Ashton, A.R. (1997): Genetic manipulation of key photosynthetic enzymes in the C₄ plant *Flaveria bidentis*. Australian Journal of Plant Physiology 24: 477 - 485

Furbank, R.T., Hatch, M.D. (1987): Mechanism of C₄ Photosynthesis: The size and composition of the inorganic carbon pool in bundle sheath cell. Plant Physiology 85: 958 - 964

Furbank, R.T., Hatch, M.D., Jenkins, C.L.D. (2000): C₄ photosynthesis: Mechanism and regulation. In: "Photosynthesis: Physiology and metabolism", ed. by. Leegood R.C., Sharkey, T.D., von Caemmerer, S., Kluwer Academic Publishers.

Furbank, R.T., Stitt, M., Foyer, C.H. (1985): Intercellular compartmentation of sucrose synthesis. *Planta* 164: 172 - 178

Furbank, R.T., Taylor, W.C. (1995): Regulation of photosynthesis in C₃ and C₄ plants: A molecular approach. *Plant Cell* 7: 797 - 807

Gao, Y., Woo, K.C. (1996): Site-directed mutagenesis of *Flaveria trinervia* phosphoenolpyruvate carboxylase: Arg⁴⁵⁰ and Arg⁷⁶⁷ are essential for catalytic activity and Lys⁸²⁹ affects substrate binding. *FEBS Letters* 392: 285 - 288

Garrity, D.P., Sullivan, C.V., Watts, D.G. (1984): Changes in grain sorghum stomatal and photosynthetic response to moisture stress across growth stages. *Crop Science* 24: 441 - 446

Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R. (1989): The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87 - 92

Genty, B., Harbinson, J., Briantais, J.M., Baker, N.R. (1990): The relationship between non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and the rate of photosystem II photochemistry in leaves. *Photosynthesis Research* 35: 67 - 78

Giglioli-Gulvarch, N., Pierre, J.N., Brown, S., Chollet, R., Vidal, J., Gadai, P. (1996): The light-dependent transduction pathway controlling the regulatory phosphorylation of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase in protoplasts from *Digitaria sanguinalis*. *Plant Cell* 8: 573 - 586

Gilmore, A.M. (1997): Mechanistic aspects of xanthophyll cycle dependent photoprotection in higher plant chloroplast and leaves. *Pysiologia Plantarum* 99: 197 - 209

Gutteridge, S., Jordan, D.B. (2001): Dynamics of photosynthetic CO₂ fixation: Control, regulation and productivity. In "Regulation of photosynthesis", ed. by Aro, E.M., Andersson, B. Kluwer Academic Publishers.

Hare, P.D., Cress, W.A., van Staden, J. (1998): Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment* 21: 535 - 553

Hatch, M.D. (1977): Light-dark mediated activation and inactivation of NADP malate dehydrogenase in isolated chloroplasts from *Zea mays*. *Plant and Cell Physiology* 3: 311 - 314

- Hatch, M.D.** (1987): C₄ photosynthesis: A unique blend modified biochemistry, anatomy und ultrastructure. *Biochimica and Biophysica Acta* 895: 81 - 106
- Hatch, M.D., Agostino, A.** (1992): Bilevel disulphide group reduction in the activation of C₄ leaf NADP malate dehydrogenase. *Plant Physiology* 100: 360 - 366
- Hatch, M.D., Kagawa, T.** (1973): Enzymes and functional capacities of mesophyll chloroplasts from plants with C₄ pathway photosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 159: 842 - 853
- Hatch, M.D., Slack, C.R.** (1966): Photosynthesis by sugarcane leaves, A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. *Biochemical Journal* 101: 103 - 111
- Hatch, M.D., Slack, C.R.** (1968): A new enzyme for the interconversion of pyruvate and phosphoenolpyruvate and its role in the C₄ dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochemical Journal* 106: 141 - 146
- Havaux, M., Gruszecki, W.I.** (1993): Heat- and light-induced chlorophyll a fluorescence changes in potato leaves containing high levels of the carotenoid zeaxanthin: Indications of a regulatory effect of zeaxanthin on thylakoid membrane fluidity. *Photochemistry and Photobiology* 58: 607 - 614
- Heldt, H.W.** (1999): *Pflanzenbiochemie*. 2 Auflage, Spektrum-Verlag, Heidelberg.
- Henson, I.E., Mahalakshmi, V., Bidinger, F.R., Alagarswamy, G.** (1981): Genotypic variation in pearl millet (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke), in the ability to accumulate abscisic acid in response to water stress. *Journal of Experimental Botany* 32 (130): 899 - 910
- Hess, D.** (1991): *Pflanzenphysiologie*. Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Horton, P., Ruban, A.V., Walters, R.G.** (1994): Regulation of light harvesting in green plants. Indication by non photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Plant Physiology* 106: 415 - 420
- Hsiao, T.C.** (1973): Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology* 24: 519 - 570
- Issakidis, E., Miginiac-Maslow, M., Decottignies, P., Jaquot, J.P., Cretin, C., Gadal, P.** (1992): Site directed mutagenesis reveals an additional thioredoxin-dependent regulatory site in the activation of recombinant *Sorghum* leaf NADP malate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* 267: 21577 - 21583

Issakidis, E., Sacrinen, M., Decottignies, P., Jaquot, J.P., Cretin, C., Gadal, P., Miginiac-Maslow, M. (1994): Identification and characterization of the second regulatory disulphide bridge of recombinant *Sorghum* leaf NADP malate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* 269: 3511 - 3517

Jagtap, V., Bhargava, S. (1994): Variation in the antioxidant metabolism of drought tolerant and drought susceptible varieties of *Sorghum bicolor*. Exposed to high light, low water and high temperature stress. *Journal of Plant Physiology* 145: 195 - 197

Jagtap, V., Bhargava, S., Streb, P., Feierabend, J. (1998): Comparative effect of water, heat and light stresses on photosynthetic reactions in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Journal of Experimental Botany* 49: 1715 - 1721

Jahns, P., Krause, G.H. (1994): Xanthophyll cycle and energy dependent fluorescence quenching in chloroplasts. *Planta* 192: 176 - 182

Jenkins, C.L.D., Hatch, M.D. (1985): Properties and reaction mechanism of leaf pyruvate, P_i dikinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 239: 53 - 62

Jiao, J.A., Podesta, F.E., Chollet, R., O'Leary, M.H., Andreo, C.S. (1990): Isolation and sequence of an active site peptide from maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase inactivated by pyridoxal 5'-phosphate. *Biochimical and Biophysical Acta* 1041: 291 - 295

Johnson, H.S., Hatch, M.D. (1970): Properties and regulation of NADP malate dehydrogenase and malic enzyme in plants with the C_4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochemical Journal* 119: 273 - 280

Jones, H.G., Hall, D.O., Corlett, J.E., Massacci, A. (1995): Drought enhances stomatal closure in response to shading in sorghum (*Sorghum bicolor*) and in millet (*Pennisetum americanum*). *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 1 - 6

Kai, Y., Matsumura, H., Inoue, T., Terada, K., Nagara, Y., Yoshinaga, T., Kihara, A., Tsumura, K., Izui, K. (1999): Three-dimensional structure of phosphoenolpyruvate carboxylase: A proposed mechanism for allosteric inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 823 - 828

Kahn, S., Andralojc, P.J., Lea, P., Parry, M.A.J. (1999): 2'-Carboxy-D-arabinitol 1-phosphate protects ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase against proteolytic breakdown. *European Journal of Biochemistry* 266: 840 - 847

- Keys, A.J., Major, I., Parry, M.A.J.** (1995): Is there an other player in the game of Rubisco regulation? *Journal of Experimental Botany* 46: 1245 - 1251
- Kidambi, S.P., Krieg, D.R., Rosenow, D.T.** (1990) Genetic variation for gas exchange rates in grain sorghum. *Plant Physiology* 92: 1211 - 1214
- Koroleva, O.Y., Brüggemann, W., Krause, G.H.** (1994): Photoinhibition, xanthophyll cycle and in vivo chlorophyll fluorescence quenching of chilling-tolerant *Oxyria digyna* and chilling -sensitive *Zea mays*. *Physiologia Plantarum* 92: 577 - 584
- Krause, G.H., Weis, E.** (1991): Chlorophyll Fluorescence an Photosynthesis: The Basics. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 313-349
- Laemmli, U.K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 - 685
- Laisk, A., Edwards, G.E.** (1998): Oxygen and electron flow in C₄ photosynthesis: Mehler reaction, photorespiration and CO₂ concentration in the bundle sheath. *Planta* 205: 632 - 645
- Larcher, W.** (1994): *Ökophysiologie der Pflanzen*. 5.Auflage, Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Lawlor, D.W.** (1990): *Photosynthese*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York..
- Lee, C.B., Rees, D., Horton, P.** (1990): Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the green algae *Dnaliella*. *Photosynthesis Research* 24: 167 - 173
- Leegood, R.C.** (1985): Regulation of photosynthetic CO₂ pathway enzymes by light and other factors. *Photosynthesis Research* 6: 247 - 259
- Leegood, R.C.** (1985): The intercellular compartmention of metabolites in leaves of *Zea mays* L.. *Planta* 164: 163 - 171
- Leegood, R.C.** (2000): Transport during C₄ photosynthesis. In: " *Photosynthesis: Physiology and metabolism*", ed. by Leegood R.C., Sharkey, T.D., von Caemmerer, S., Kluwer Academic Publishers.
- Leegood, R.C., Adcock, M.D., Doncaster, H.D.** (1989): Analysis of the control of photosynthesis in C₄ plants by changing in light and carbon dioxide. *Philosophical Transactions of the Royal Society London* 323: 339 - 355

Leegood, R.C., Furbank, R.T. (1984): Carbon metabolism and gas exchange in leaf of *Zea mays* L.
Planta 162: 450 - 456

Leegood, R.C., von Caemmerer, S. (1989): Some Relationships between contents of photosynthetic intermediates and the rate of photosynthetic carbon assimilation in leaves of *Zea mays* L.
Planta 178: 258 - 266

Lemaire, M., Schmitter, J.M., Issakidis, E., Miginiac-Maslow, M., Gadal, P., Decottignies, P. (1994): Essential histidine at the active site of *Sorghum* leaf NADP-dependent malate dehydrogenase.
Journal of Biological Chemistry 269(44): 27291 - 27296

Lichtenthaler, H.K. (1987): Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes.
Methods Enzymology 148: 350 - 382

Loreto, F., Tricoli, D., DiMarco, G. (1995): On the relationship between electron transport rate and photosynthesis in leaves of the C₄ plant *Sorghum bicolor* exposed to water stress, temperature changes and carbon metabolism inhibition. Australian Journal of Plant Physiology 22: 885 - 892

Lowry, O.H., Passoneau, J.V. (1972): A flexible system of enzymatic analysis. Academic press, London

Ludlow, M.M., Santamaria, J.M., Fukai, S. (1990): Contribution of osmotic adjustment to grain yield in *Sorghum bicolor* (L.) Moench under water limited conditions. II. Water stress after anthesis.
Australian Journal of Agriculture Research 41:67 - 78

Lüttke, U., Kluge, M., Bauer, G. (2002): Botanik. 4 Auflage, Wiley-VCH, Weinheim

Mäkelä, P., Munns, R., Colmer, T.D., Condon, A.G., Peltonen-Sainio, P. (1998): Effect of foliar applications of glycine betaine on stomatal conductance, abscisic acid and solute concentrations in leaves of salt- or drought stressed tomato. Australian Journal of Plant Physiology 25: 655 - 663

Mansfield, A.T., McAinsh, M.R. (1995): Hormones as Regulators of Water Balance.
In: "Plant Hormones", ed. by Davies, P.J., Kluwer Academic Publishers

Maroco, J.P., Ku, M.S.B., Furbank, R.T., Lea, P.J., Leegood, R.C. Edward, G.E. (1998): CO₂ and O₂ dependence of PS II activity in C₄ plants having genetically produced deficiencies in the C₃ or C₄ cycle.
Photosynthesis Research 58: 91 - 101

- Masojidek, J., Trivedi, S., Halshaw, L., Alexiou, A., Hall, D.O.** (1991): The synergistic effect of drought and light stresses in Sorghum and Pearl millet. *Plant Physiology* 96: 198 - 207
- Massacci, A., Battistelli, B., Loreto, F.** (1996): Effect of drought stress on photosynthetic characteristics, growth and sugar accumulation of field-grown sweet Sorghum. *Australian Journal of Plant Physiology* 23: 331 - 340
- Metzler, M.C., Rothermel, B.A., Nelson, T.** (1989): Maize NADP malate dehydrogenase: cDNA cloning, sequence, and mRNA characterization. *Plant Molecular Biology* 12: 713 - 722
- Miginiac-Maslow, M., Johansson, K., Ruelland, E., Issakidis-Bourguet, E., Schepens, I., Goyer, A., Lemaire-Chamley, M., Jacquot, J.P., Decottignies, P.** (2000): Light-activation of NADP-malate dehydrogenase: A highly controlled process for an optimized function. *Pysiologia Plantarum* 110: 322 - 329
- Miziorko, H.M., Nowak, T., Mildvan, A.S.** (1974): Spinach leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: purification, properties and kinetic studies. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 163: 378 - 389
- Nakamoto, H., Edwards, G.E.** (1987): Effect of adenine nucleotides on the reaction catalysed by the pyruvate, P_i dikinase in maize. *Biochimical and Biophysical Acta* 924: 360 - 368
- Namuco, O.S., O'Toole, J.C.** (1986): Reproductive stage, water stress and sterility. I. Effect of stress during meiosis. *Crop Science* 26: 317-321
- Nimmo, G.A., Nimmo, H.G., Fewson, C.A., Wilkins, M.B.** (1984): Diurnal changes in the properties of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Bryophyllum* leaves: A possible covalent modification. *FEBS Letters* 178: 199 - 203
- Nishizawa, A.N., Buchanan, B.B.** (1981): Enzyme regulation in C_4 photosynthesis. Purification and properties of thioredoxin-linked fructose biphosphatase and sedoheptulose biphosphatase from corn leaves. *Journal of Biological Chemistry* 256: 6119 - 6126
- Niyogi, K.K.** (2000): Safety valves for photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 455 - 460
- Oja, V., Savchenko, G., Jakob, B., Heber, U.** (1999): pH and buffer capacities of apoplasmatic and cytoplasmatic cell compartment in leaves. *Planta* 209: 239 - 249

O'Leary, M.H. (1982): Phosphoenolpyruvate carboxylase: An enzymologists view.

Annual reviews of Plant Physiology 33: 297 - 315

Öquist, G., Chow, W.S., Anderson, J.M. (1992): Photoinhibition of photosynthesis represents a mechanism for long -term regulation of photosystem II. *Planta* 186: 450 - 460

Ottman, M.J., Kimball, B.A., Pinter, P.J., Wall, G.W., Vanderlip, R.I., Leavitt, S.W., LaMorte, R.I., Matthias, A.D., Brooks, T.J. (2001): Elevated CO₂ increases sorghum biomass under drought conditions. *New Phytologist* 150: 261 - 273

Parry, M.A.J., Andralolajc, P.J., Parmar, S., Keys, A.J., Habash, D., Paul, M.J., Alred, R., Quick, W.P., Servaites, J.C. (1997): Regulation of Rubisco by inhibitors in the light. *Plant, Cell and Environment* 20: 528 - 534

Pfündel, E., Nagel, E., Meister, A. (1996): Analysing the light distribution in the photosynthetic apparatus of C₄ plants using highly purified mesophyll and bundle-sheath thylakoids. *Plant Physiology* 112: 1055 - 1070

Premachandra, G.S., Hahn, D.T., Joly, R.J. (1994) Leaf water relations and gas exchange in two grain Sorghum genotypes differing in their pre- and postflowering drought tolerance. *Journal of Plant Physiology* 143: 96 - 101

Premachandra, G.S., Hahn, D.T., Rhodes, D., Joly, R.J. (1995): Leaf water relations and solute accumulation in two grain Sorghum lines contrasting drought tolerance. *Journal of Experimental Botany* 46: 1833 - 1841

Quartacci, M.F., Navari-Izzo, F. (1992): Water stress and free radical mediated changes in sunflower seedlings. *Journal of Plant Physiology* 139: 621 - 625

Quick, W.P., Stitt, M. (1989): An examination of factors contributing to non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in barley leaves. *Biochimica et Biophysica Acta* 977: 287 - 296

Quisenberry, J.E., Wendt C.W., Berlin, J.D., McMichael, B.L. (1985): Potential for using leaf turgidity to select drought tolerance in cotton. *Crop Science* 21: 889 - 895

Rau, W. (1988): Functions of carotinoids other than in photosynthesis. In: "Plant Pigments", ed. by T. W. Goodwin, Academic Press, London

- Roeske, C.A., Chollet, R.** (1989): Role of metabolites in the reversible light activation of pyruvate, P_i dikinase in *Zea mays* mesophyll cells in vivo. *Plant Physiology* 90: 330 - 337
- Saccardy, K., Pineau, B., Roche, O., Cornic, G.** (1998): Photochemical efficiency of photosystem II and xanthophyll cycle components in *Zea mays* leaves exposed to water stress and high light. *Photosynthesis Research* 56: 57 - 66
- Sanchez, A.C., Subudhi, P.K., Rosenow, D.T., Nguyen, H.T.** (2002): Mapping QTLs associated with drought resistance in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Plant Molecular Biology* 48: 713 - 726
- Scheffer, F., Schachtschnabel, P.** (1984): Lehrbuch der Bodenkunde. 11. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart
- Scheibe, R., Stitt, M.** (1988): Comparison of NADP malate dehydrogenase activation, Q_A reduction and O₂ evolution in spinach leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 26(4): 473 - 481
- Schepens, I., Ruelland, E., Miginiac-Maslow, M., LeMarechal, P., Decottignies, P.** (2000): The role of active site arginines of *Sorghum* NADP-malate dehydrogenase in thioredoxin dependent activation and activity. *Journal of Biological Chemistry* 275 (46): 35792 - 35798
- Scholander, P.F., et al.** (1965): Sap pressure in vascular plants. *Science* 148: 339 - 346
- Schreiber, U.** (1986): Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated fluorometer. *Photosynthesis Research* 9: 261-272
- Seemann, J. R. et al.** (1984): Variations in the Specific Activity of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase between Species Utilizing Differing Photosynthetic Pathways. *Plant Physiology* 74: 791 - 794
- Servaites, J.C., Geiger, D.R.** (1995): Regulation of ribulose 1,5-bisphosphat carboxylase/oxygenase by metabolites. *Journal of Experimental Botany* 46: 1277 - 1283
- Somersalo, S., Krause, G.H.** (1990): Effects of freezing and subsequent light stress on photosynthesis of spinach leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 28: 467 - 475
- Stiborova, M.** (1988): Phosphoenolpyruvate carboxylase: The key enzyme of C₄ photosynthesis. *Photosynthetica* 22: 240 - 263

- Stitt, M., Heldt, H.W.** (1985): Generation and maintenance of concentration gradients between the mesophyll and bundle sheath in maize leaves. *Biochimica and Biophysica Acta* 808: 400 - 414
- Stitt, M., Schulz, D.** (1994): Does Rubisco control the rate of photosynthesis and plant growth? An exercise in molecular ecophysiology. *Plant, Cell and Environment* 17: 465 - 487
- Strasburger, E.** (1991): *Lehrbuch der Botanik*. 33. Auflage, Gustav-Fischer Verlag, Stuttgart
- Tewolde, H., Dobrenz, A.K., Voigt, R.L.** (1993): Seasonal trends in leaf photosynthesis and stomatal conductance of drought stressed and nonstressed pearl millet as associated to vapor pressure deficit. *Photosynthesis Research* 38: 41 - 49
- Thayer, S.S., Björkmann, O.** (1992): Carotenoid distribution and deepoxidation in pigment-protein complexes from cotton leaves and bundle-sheath cells of maize. *Photosynthesis Research* 33: 213 - 225
- Thiele, A., Krause, G.H.** (1994): Xanthophyll cycle and thermal dissipation in photosystem II: relationship between zeaxanthin formation, energy depend fluorescence quenching and photoinhibition. *Journal of Plant Physiology* 144: 324 - 332
- Thiele, A., Schirwitz, K., Winter, K., Krause, G.H.** (1996): Increased xanthophyll cycle activity and reduced D1 protein inactivation related to photoinhibition in two plant systems acclimated to excess light. *Plant Science* 115: 237 - 250
- Tuinstra, M.R., Ejata, G., Goldsborough, P.B.,** (1997): Heterogeneous inbred family (HIF) analysis: a method for developing near-isogenetic lines that differ at quantitative trait loci. *Theoretical Applied Genetics* 95: 1005 - 1011
- Tuinstra, M.R., Grote, E.M., Goldsborough, P.B., Ejata, G.** (1996): identification of quantitative trait loci associated with pre-flowering drought tolerance in *Sorghum*. *Crop Science* 36: 1337 - 1344
- Tuinstra, M.R., Grote, E.M., Goldsborough, P.B., Ejata, G.** (1997): Genetic analysis of post-flowering drought tolerance and components of grain development in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Molecular Breeding* 3: 439 - 448
- Tumanow, I.I.** (1927): Ungenügende Wasserversorgung und das Welken der Pflanzen als Mittel zur Erhöhung ihrer Dürre-resistenz. *Planta* 3: 391 - 480

Usuda, H. (1997): Changes in levels of intermediates of the C₄ cycle and reductive pentose phosphate pathway under various concentrations of CO₂ in maize leaves. *Plant Physiology* 83: 29 - 32

Usuda, H., Ku, M.S.B., Edwards, G.E. (1984): Activation of NADP malate dehydrogenase, pyruvate, P_i dikinase and fructose 1,6-bisphosphatase in relation to photosynthetic rate in maize. *Plant Physiology* 76: 238 - 243

Vidal, J., Chollet, R. (1997): Regulatory phosphorylation of C₄ PEP carboxylase. *Trends in Plant Science* 2: 230 - 237

Vidal, J., Coursol, S., Pierre, J.N. (2001): Reversible phosphorylation in the regulation of photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase in C₄ plants. In "Regulation of photosynthesis", ed. by. Aro, E.M., Andersson, B. Kluwer Academic Publishers

von Caemmerer, S., Farquhar, G.D. (1981): Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153: 376 - 387

Wall, G.W., Brooks, T.J., Adam, N.R., Cousins, A.B., Kimball, B.A., Pinter Jr, P.J., LaMorte, R.L., Triggs, J., Ottman, M.J., Leavitt, R., Matthias, A.D., Williams, D.G., Webber, A.N. (2001): Elevated atmospheric CO₂ improved *Sorghum* plant water status by ameliorating the adverse effects of drought. *New Phytologist* 152: 231 - 248

Walter, H., Kreeb, K. (1970): Die Hydratation und Hydratur des Protoplasmas der Pflanzen und ihre ökophysiologische Bedeutung. *Protoplasmatologia* II C6, 119 - 141, Springer Verlag, Wien/New York

Walters, R.G., Horton, P. (1991): Resolution of components of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in barley leaves. *Photosynthesis Research* 27: 121 - 133

Watling, J.R., Press, M., Quick, W.P. (2000): Elevated CO₂ induces biochemical and ultrastructural changes in leaves of the C₄ cereal sorghum. *Plant Physiology* 123: 1143 - 1152

Weiner, H., Heldt, H.W. (1992): Inter- and intracellular distribution of amino acids and other metabolites in maize (*Zea mays* L.) leaves. *Planta* 187: 242 - 246

Williams, D.G., Gempko, V., Fravolini, A., Leavitt, S.W., Wall, G.W., Kimball, B.A., Pinter Jr, P.J., LaMotte, R., Ottman, M. (2001): Carbon isotope discrimination by *Sorghum bicolor* under CO₂ enrichment and drought. *New Phytologist* 150: 285 - 293

- Winkel, T., Reno, J.F., Payne, W.A.** (1997): Effect of the timing of water deficit on growth, phenology and yield of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) grown in sahelian conditions. Journal of Experimental Botany 48: 1001 - 1009
- Wood, A.J., Goldsbrough, P.B.** (1997): Characterization and expression of dehydrins in water-stressed *Sorghum bicolor*. Physiologia Plantarum 99: 144 - 152
- Wright, G.C., Smith, R.G.C., Morgan, J.M.** (1983): Differences between two grain sorghum genotypes in adaption to drought stress. III: Physiological responses. Australian Journal of Agricultural Research 34: 637 - 651
- Yang, G., Rhodes, D., Joly, R.J.** (1996): Effects of high temperature on membrane stability and chlorophyll fluorescence in glycinebetaine-deficient and glycinebetaine-containing maize lines. Australian Journal of Plant Physiology 23: 437 - 443
- Yeoh, H.H., Badger, M. R., Watson, L.** (1980): Variations in K_m (CO_2) of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase among Grasses. Plant Physiology 66: 1110 - 1112
- Yin, Z. H., Dietz, K.J., Heber, U.** (1990): Light-dependent pH changes in leaves of C_3 plants. III. Effect of inhibitors of photosynthesis and of the developmental state of photosynthetic apparatus on cytosolic and vascular pH changes. Planta 182: 244 - 252
- Yin, Z. H., Neimanis, S., Heber, U.** (1990): Light-dependent pH changes in leaves of C_3 plants. II. Effect of CO_2 and O_2 on the cytosolic and the vascular pH. Planta 182: 253 - 261
- Yin, Z. H., Neimanis, S., Wagner, U., Heber, U.** (1990): Light-dependent pH changes in leaves of C_3 plants. I. Recording pH changes in various cellular compartments by fluorescent probes. Planta 182: 244 - 252
- Yin, Z.H., Heber, U., Raghavendra, A.S.** (1993): Light-induced pH changes in leaves of C_4 plants. Planta 189: 267 - 277
- Zhang, J., Kirkham, M.B.** (1996): Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. New Phytologist 132: 361 - 373

Online-Quellen und Datenbanken aus dem World Wide Web:

Welternährungsorganisation FAO, USA

www.fao.org

Internationalen Forschungsinstitut für Pflanzenbau in den semiariden Tropen, Indien

www.icrisat.org

II Abkürzungsverzeichnis:

▪ ADP	Adenosin-5'-diphosphat
▪ Abb.	Abbildung
▪ ATP	Adenosin-5'-triphosphat
▪ BSA	Rinderserumalbumin
▪ C_i	interzelluläre CO_2 -Konzentration
▪ d	day (Tag)
▪ DEPS	Deepoxidationsstatus
▪ DNA	Desoxyribonucleinsäure
▪ DTT	Dithiothreitol
▪ E	Extinktionskoeffizient
▪ EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
▪ FBPase	Fruktose-1,6-bisphosphatase
▪ h	Stunde
▪ Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
▪ HPLC	High pressure liquid chromatographie (Flüssigkeits-Hochdruck-Chromatographie)
▪ kDa	Kilodalton
▪ M	Molar
▪ MDH	Malatdehydrogenase
▪ ME	Malatenzym
▪ mg	Milligramm
▪ min	Minute
▪ ml	Milliliter
▪ mm	Millimeter
▪ mM	Millimolar
▪ NADP	oxidierte Form des Nicotinamid-adenin- dinucleotid-phosphat
▪ NADPH	reduzierte Form des Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
▪ nm	Nanometer
▪ OA	Oxalacetat
▪ PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
▪ PEG	Polyethylenglycoll
▪ PEP	Phospho- <i>enol</i> -pyruvat
▪ PEPCase	Phospho- <i>enol</i> -pyruvat Carboxylase
▪ PFD	Photone flux density (Lichtstärke)
▪ pmol	Picomol
▪ PPDK	Pyruvat-orthophosphat-dikinase
▪ ppm	parts per million (Teile pro Million)
▪ PS I	Photosystem I
▪ PS II	Photosystem II
▪ PS	Photosynthese
▪ PTFE	Teflon
▪ RNA	Ribonucleinsäure
▪ rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
▪ Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
▪ SDS	Natriumdodecylsulfat
▪ TMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
▪ Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
▪ U	Unit
▪ μE	Mikro-Einstein
▪ μg	Mikrogramm
▪ μl	Mikroliter
▪ V	Volt
▪ v/v	Volumen pro Volumen
▪ w/v	Gewicht pro Volumen
▪ WSD	Wassersättigungsdefizit

III Abbildungsverzeichnis:

- Abb. 1.1: Blühende *Sorghum bicolor* - 2
- Abb. 1.2: Verbreitung und Anbau von *Sorghum bicolor*. - 2
- Abb. 1.3: Empfindlichkeit von Zellfunktionen auf Wassermangel. - 5
- Abb. 1.4: Querschnitt durch ein C₄-Blatt. - 7
- Abb. 1.5: C₄-Stoffwechsel (NADPH-Malat-Typ) - 8
- Abb. 2.1: Beziehung zwischen Wassergehalt und Wasserspannung unterschiedlicher Bodentypen. - 12
- Abb. 2.2: Druckkammer zur Messung negativer Drücke. - 14
- Abb. 2.3: Chlorophyllfluoreszenzkurve - 18
- Abb. 2.4: Beispielchromatogramm - 22
- Abb. 2.5: Western Blot Apparatur - 30
- Abb. 3.1: Wassergehalte der Bodenproben. - 34
- Abb. 3.2: Wassergehalt und Wasserspannungskurve des verwendeten Substrats. - 35
- Abb. 3.3: Beziehung zwischen Blattdruckpotential und osmotischem Potential. - 36
- Abb. 3.4: Beziehung zwischen Blattdruckpotential und Wassersättigungsdefizit. - 36
- Abb. 3.5: Lichtabhängigkeit der Photosynthese. - 37
- Abb. 3.6: Photosyntheseraten verschiedener Kultivare in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. - 38
- Abb. 3.7: Blattschäden - 39
- Abb. 3.8: Quantifizierung der geschädigten Blattfläche. - 39
- Abb. 3.9: Blattflächenbezogene Transpirationsraten. - 40
- Abb. 3.10: Blattunterseite B 35, Epidermis mit Stomata. - 41
- Abb. 3.11: Stomata pro Blattfläche. - 41
- Abb. 3.12: Photosynthese in Abhängigkeit des Entwicklungszustands und des Blattdruckpotentials. - 42
- Abb. 3.13: F_v/F_m-Verhältnis in Abhängigkeit des Entwicklungszustands und des Blattdruckpotentials. - 44
- Abb. 3.14: Chlorophyllgehalte - 45
- Abb. 3.15: Carotinoidgehalte - 46
- Abb. 3.16: Photosyntheseraten in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. - 48
- Abb. 3.17: Stomatäre Leitfähigkeit in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. - 49
- Abb. 3.18: Photosyntheserate in Abhängigkeit der stomatären Leitfähigkeit. - 50
- Abb. 3.19: Interzelluläre CO₂-Konzentration in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. - 51
- Abb. 3.20: Photosyntheserate in Abhängigkeit des CO₂-Gehaltes des Meßgases. - 52
- Abb. 3.21: Stomatäre Leitfähigkeit in Abhängigkeit des CO₂-Gehaltes des Meßgases. - 53
- Abb. 3.22: Interzellulärer CO₂-Gehalt in Abhängigkeit der äußeren CO₂-Konzentration. - 54
- Abb. 3.23: Photosyntheserate in Abhängigkeit des interzellulären CO₂-Gehalts. - 55
- Abb. 3.24: F_v/F_m-Verhältnis in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. - 56
- Abb. 3.25: q_p in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. - 57

- Abb. 3.26: Quantenausbeute in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. - 58
- Abb. 3.27: q_n in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. - 58
- Abb. 3.28: q_f in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. - 59
- Abb. 3.29: q_i in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. - 60
- Abb. 3.30: F_v/F_m -Verhältnis in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. - 61
- Abb. 3.31: q_p in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. - 62
- Abb. 3.32: Quantenausbeute in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. - 62
- Abb. 3.33: q_n in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. - 63
- Abb. 3.34: q_f in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. - 64
- Abb. 3.35: q_i in Abhängigkeit des Blattdruckpotentials. - 64
- Abb. 3.36: PPDK-Aktivität in Abhängigkeit der Photosyntheserate. - 66
- Abb. 3.37: PEPCase-Aktivität in Abhängigkeit der Photosyntheserate. - 67
- Abb. 3.38: PEPCase-Aktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes. - 68
- Abb. 3.39: PEPCase-Aktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes in Anwesenheit von 10mM Malat. - 69
- Abb. 3.40: PEPCase-Aktivität in Abhängigkeit der Malatkonzentration bei pH 7,3. - 69
- Abb. 3.41: MDH-Aktivität in Abhängigkeit der Photosynthese. - 70
- Abb. 3.42: MDH-Aktivierungsgrad in Abhängigkeit der Photosynthese. - 71
- Abb. 3.43: ME-Aktivität in Abhängigkeit der Photosynthese. - 72
- Abb. 3.44: Rubisco-Aktivität in Abhängigkeit der Photosynthese. - 73
- Abb. 3.45: SDS-PAGE aller *Sorghum* und *Lycopersicon* Proben. - 74
- Abb. 3.46: Western-Blot mit PEPCase-Antikörper. - 74
- Abb. 3.47: Western-Blot mit Rubisco-Antikörper. - 75
- Abb. 3.48: Rubisco-Aktivität und Rubisco-Gehalt in Abhängigkeit der Photosynthese. - 76
- Abb. 3.49: FBPase-Aktivität in Abhängigkeit der Photosynthese. - 77
- Abb. 3.50: Kinetik der Deepoxidation der Kontrollpflanzen. - 78
- Abb. 3.51: Kinetik der Deepoxidation der gestreßten Pflanzen. - 79
- Abb. 3.52: Pigmentverteilung in Kontrollpflanzen und gestreßten Pflanzen. - 80
- Abb. 3.53: Carotinoidverteilung in Kontrollpflanzen und gestreßten Pflanzen. - 81
- Abb. 3.54: Malatgehalt pro Frischgewicht in Kontrollpflanzen und gestreßten Pflanzen. - 82
- Abb. 3.55: Pyruvatgehalt pro Frischgewicht in Kontrollpflanzen und gestreßten Pflanzen. - 83
- Abb. 3.56: Oxalacetatgehalt pro Frischgewicht in Kontrollpflanzen und gestreßten Pflanzen. - 84
- Abb. 3.57: PEP-Gehalt pro Frischgewicht in Kontrollpflanzen und gestreßten Pflanzen. - 85
- Abb. 4.1: Regulation der PEPCase durch Effektoren - 103

IV Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Weltgetreideproduktion 2001. - 1

Tab. 1.2: Sorghum Produktion und Ertrag, 2001. - 3

Tab. 2.1: Verwendete *Sorghum* Linien - 11

Tab. 2.2: Retentionszeiten und Umrechnungsfaktor der eluierten Pigmente. - 22

Tab. 3.1: Chl. a/b und Chl./Car.-Verhältnis von Kontrollpflanzen und gestreßten Pflanzen. - 47

Tab. 3.2: Korrelationsanalyse der Photosynthese und Fluoreszenzparametern. - 65

Tab. 3.3: Rubisco-Gehalt pro Blattfläche und Gesamtprotein. - 75

Tab. 3.4: Spezifische Rubisco-Aktivität. - 77

Tab. 4.1: Effektoren der PEPCase. - 100

Tab. 4.2: Abgeschätzte Metaboliten Konzentrationen in Mesophyll- und Bündelscheidenzellen. - 101

Tab. 4.3: Umrechnung der Metabolitgehalte in Konzentrationen. - 102

V Danksagung

*»Wir sind schließlich damit vertraut,
daß alles Menschwerk irgendwie Stückwerk ist;
oftmals bleibt es unvollendet - niemals wird es vollkommen«*

Viktor Frankl

Nun ist es also soweit, die vorliegende Arbeit ist endlich fertiggestellt. Einige Fragen konnten im Rahmen dieser Arbeit leider nicht geklärt werden, viele neue Fragen ergeben sich aus ihr. Vielleicht findet sich ja ein Unerschrockener der auf diesem Feld weiter streiten wird.

Den Menschen, die mein Weiterkommen in den letzten Jahren ermöglicht und unterstützt haben, möchte ich an dieser Stelle danken:

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Brüggemann danke ich für das "Transferangebot" an die Frankfurter Universität und die großen Freiheiten, um die mich viele meiner Kollegen beneidet haben.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Sandmann danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Renate Pathe und Ulrike Feickert, haben ein frühes Scheitern meiner Promotion mehrfach verhindert, indem sie mich nach kleineren und größeren Katastrophen immer wieder aufgebaut haben, wenn ich eigentlich schon alles hinwerfen wollte.

Mit Petra, Karin und Volki fühlte ich mich als "Exil-Rheinländer" im fremden Hessen natürlich besonders verbunden, die hessischen und portugiesischen Kollegen Holger, Anita und Maria zeigten mir, daß nette Kollegen nicht nur aus dem Rheinlands kommen; danke für Eure Tips und Hilfe im Labor, sowie die unzähligen Stunden am Kaffeeautomaten.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe und des botanischen Instituts möchte ich für ihre große Hilfsbereitschaft danken, wenn ich einmal wieder Unterstützung für mehr oder weniger ausgereifte Pläne suchte, oder irgend etwas schnell organisiert oder repariert werden mußte.

Vielen Dank den Gärtnern die sich am Wochenende meiner Versuchspflanzen angenommen haben, auch wenn es ihnen im Innersten widerstrebte meine Pflanzen bewußt vertrocknen zu lassen.

Danke meiner Freundin Birthe die alles für mich tut, zu mir nach Frankfurt gezogen ist und mich so vor schwerwiegenden Erfrierungen bei den Motorradfahrten im Winter nach Duisburg bewahrt hat.

Meinen Eltern und Großeltern möchte ich für ihre ideelle und finanzielle Unterstützung während meines Studiums danken, wie auch meiner Schwester Kathrin, die erneut die schwere Aufgabe übernommen hat Kommata an die richtige Stelle zu bringen und die gleichlautende Satzanfänge meiner Nebensätze auf ein erträgliches Maß zu reduzieren.

VI Curriculum vitae

Persönliche

Daten:

Name: Volker Beyel
 geboren am: 15.06.1971 in Euskirchen
 Familienstand: ledig

Schulausbildung:

08.1981 - 07.1990 St. Bernhard Gymnasium in Willich-Schiefbahn
 Abschluß: allgemeine Hochschulreife
 08.1977 - 07.1981 Grundschule Vulkanstraße in Krefeld Stahldorf

Zivildienst:

08.1990 - 10.1991 Zivildienst beim Landesverband Nordrhein der Deutschen-Lebensrettungs-Gesellschaft (DLRG) in Düsseldorf

Studium:

11.1991 - 03.1998 Biologie an der Heinrich Heine Universität in Düsseldorf
 Abschluß: Diplom
 Thema der Diplomarbeit:
 "Untersuchungen zur Rolle der Superoxid-Dismutase im Chloroplasten von Tomaten"

ausgeübte

Tätigkeit:

seit 05.1998 wiss. Mitarbeiter im botanischen Institut der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 13.2.2003